

Caracterización preliminar de Aspartato transcarbamoilasa (ATC) de *Phytophthora infestans*.

Bello, J.^{1,2}, Garavito, MF.^{1,2}, Vásquez, J.^{1,2}, Restrepo, S.¹, Zimmermann, BH.²

1. Laboratorio de Micología y Fitopatología, Universidad de los Andes (LAMFU), Bogotá, Colombia.

2. Grupo de Investigaciones en Bioquímica y Biología Molecular de Parásitos, Universidad de los Andes (BBMP), Bogotá, Colombia.

Resumen: Aspartato transcarbamoilasa (ATC) y en general la ruta completa de síntesis *de novo* de pirimidinas es considerada como un blanco potencial para el control de parásitos pertenecientes al Phylum *Apicomplexa*, así como para el control de fitopatógenos de la clase *Oomycota*, quienes anualmente causan millonarias pérdidas en agricultura a nivel mundial. Sin embargo, ATC nunca ha sido estudiada en fitopatógenos pertenecientes al género *Phytophthora*, por lo que este trabajo desarrolla una caracterización preliminar de la Aspartato transcarbamoilasa de *Phytophthora infestans* (PiATC). Un análisis filogenético preliminar, desarrollado mediante inferencia bayesiana, mostro el potencial de PiATC como blanco para el control de *P. infestans*, debido a la distante relación filogenética que esta presenta con respecto a la proteína StATC de su hospedero *S. tuberosum*. La clonación y expresión proteica se llevó a cabo a partir del vector de expresión pET-15b-PiATC transformado mediante electroporación en *E. coli* BL21CodonPlus(DE3)RP. La proteína mostró un peso aproximado de 39KDa acorde con lo esperado y fue expresada en forma soluble mediante su inducción con IPTG. La producción de la proteína recombinante alcanzo un rendimiento máximo 7mg por litro de cultivo, y su purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad con el uso de la columna Ni-NTA (Qiagen). La actividad específica de la enzima PiATC mostró un valor de 340 uMCAA/h•mgATC, el cual es un valor bastante bajo en comparación con los valores de las ATC's de organismos filogenéticamente cercanos. Por último, modelaje y posterior docking molecular de PiATC sugieren un trímero catalítico como la estructura cuaternaria más probable.

Palabras clave: Aspartato transcarbamoilasa, Fitopatógeno, Síntesis *de novo* de pirimidinas, *Phytophthora infestans*, *Oomycota*, Actividad específica

INTRODUCCIÓN

Los miembros de las especies del género *Phytophthora* pertenecientes a la clase *Oomycota* son considerados como algunos de los fitopatógenos más importantes a nivel mundial, debido a su responsabilidad anual por millonarias de pérdidas económicas en la agricultura (Lamour *et al.*, 2007; Attard *et al.*, 2008). *P. infestans* es el agente causal del tizón tardío de la papa y el responsable de la hambruna irlandesa del siglo XIX, por lo que es considerado como un fitopatógeno de importancia y el estudio de su biología se ha desarrollado ampliamente a través de los años (Lamour *et al.*, 2007). Sin embargo, estrategias cien por ciento efectivas para el control de este fitopatógeno actualmente no están disponibles, por lo que el desarrollo de estas resulta en extremo importante (Nicholls H., 2004).

Entre la amplia variedad de plantas hospederas del género *Phytophthora* se encuentran las especies de la familia *solanácea*, consideradas como el tercer taxón botánico más importante a nivel agronómico en el mundo, por lo que actualmente existe un gran desarrollo en el estudio de su biología, ecología y distribución (Buysens *et al.*, 1996).

Solanum tuberosum (papa), *Solanum lycopersicum* (tomate) y *Physalis peruviana* (uchuva) son solo algunas de las más representativas especies pertenecientes a la familia *solanácea*. Sin embargo, *S. tuberosum* constituye el más importante cultivo en cuanto a las *solanáceas* refiere, pues es el cuarto cultivo alimenticio más importante a nivel mundial, con una producción anual cercana a las 30 millones de toneladas.

No obstante, *S. tuberosum* y en general la mayoría de las *solanáceas*, padecen problemáticas asociadas a fitopatógenos no solo pertenecientes al

género *Phytophthora*, sino también a los géneros *Pythium*, *Alternaria* y *Ralstonia* entre otros; los cuales causan millonarias pérdidas agrícolas, por lo que el desarrollo de estrategias que contribuyan al control de estos fitopatógenos son importantes para las economías globales (Buysens *et al.*, 1996; Carreño *et al.*, 2007).

A pesar de la amplia variedad de fitopatógenos que las solanáceas enfrentan, *P. infestans* se consolida como el más importante, debido a su alta incidencia, agresividad y difícil control (Lamour *et al.*, 2007). En Colombia, el tizón tardío de la papa fue reportado por primera vez en 1927 por Toro y colaboradores; y teniendo en cuenta que el país es el tercer productor más grande de papa en Suramérica, con una producción anual cercana a los 3 millones de toneladas, *P. infestans* es materia constante preocupación.

Por lo tanto, con el fin de desarrollar estrategias que permitan el control de este fitopatógeno, es importante tener en cuenta que las estrategias desarrolladas para el control de hongos verdaderos no son del todo certeras en *P. infestans*, debido a que este carece de la mayoría de los targets de fungicidas usados para el manejo de los cultivos, posee una amplia resistencia y su relación filogenética con los hongos es distante (Attard *et al.*, 2008; Haldar *et al.*, 2006)

Sin embargo, a diferencia de la distante relación filogenética entre hongos verdaderos y *Oomycota*, los parásitos *Apicomplexa* presentan una estrecha relación filogenética con estos últimos y estudios recientes han mostrado una alta similaridad en sus mecanismos de patogenicidad (Lamour *et al.*, 2007; Martens *et al.*, 2008; Haldar *et al.*, 2006). Por lo tanto, una posible solución para el control de estos patógenos basada en su estrecha relación filogenética con los *Apicomplexa* surge, debido que es razonable considerar que las estrategias desarrolladas para el control los *Apicomplexa*, podrían ser también aplicables para el control de los *Oomycota*. Así, las estrategias para el control del organismo modelo de este Phylum, *Plasmodium falciparum*, en inhibición de la síntesis de *de novo* de pirimidinas (Hyde, 2007) intentan aplicarse para el control del *Oomycota*, *P. infestans*.

La síntesis de pirimidinas, es una ruta metabólica que juega un papel primordial en la síntesis de ácidos nucleicos en la mayoría de los organismos, que puede llevarse a cabo mediante dos rutas diferentes dependiendo del estado de desarrollo en el que se encuentre la célula: la primera consiste en el reciclaje de nucleótidos (ruta de reciclaje) y la segunda implica la biosíntesis de los mismos (ruta de síntesis *de novo*) (Evans & Guy, 2004). Sin embargo, es esta última la que constituye el blanco más importante para el control de organismos patógenos, debido a la alta demanda de nucleótidos que estos presentan para su proliferación celular, los cuales no pueden ser compensados por la ruta de reciclaje (Evans & Guy, 2004, Hyde J., 2007). En procesos como la germinación de *P. infestans* las pirimidinas parecen ser obtenidas en su mayoría a partir de la síntesis *de novo* y no a partir de la ruta de reciclaje (García *et al.*, comunicación personal), un escenario muy diferente al presentado por su hospedero *S. tuberosum* donde los diferentes tejidos de la planta, requieren diferentes proporciones de cada ruta (Clark *et al.*, 1978; Geigenberger *et al.*, 2005).

En consecuencia, nosotros proponemos desarrollar un bloqueo de la síntesis *de novo* de pirimidinas en alguno de los 7 pasos enzimáticos que constituyen la ruta, catalizados por las enzimas: Carboamil fosfato sintetasa (CPS), Aspartato Transcarbamoilasa (ATC), Dihidroorotasa (DHO), Dihidroorotato deshidrogenasa (DHOD), Orotato fosforibosil Transferasa (OPRT), Orotidin Monofosfato Descarboxilasa (ODC) y CTP-sintasa (CTP), pues cada una de ellas podría ser inhibida de diferentes maneras con el uso de inhibidores (Evans & Guy., 2004). Sin embargo, para el desarrollo de este tipo de inhibición, es importante tener en cuenta que ésta es una ruta metabólica conservada en la mayoría de los organismos, por lo que los porcentajes de similaridad de las enzimas implicadas podrían resultar elevados entre especies. De esta manera, para el desarrollo de una debida inhibición, es necesario realizar una caracterización molecular y bioquímica de las enzimas blanco de inhibición del pato-sistema, con el fin de encontrar o sintetizar inhibidores especie-específicos.

Este trabajo tiene como objetivo generar la caracterización molecular y bioquímica de la enzima Aspartato Transcarbamoilasa de *Phytophthora infestans* (PiATC) con el fin de evaluar su potencial como blanco para la inhibición de la síntesis *de novo* de pirimidinas, a través del uso de inhibidores especie específicos, que permitan controlar el tizón tardío de la papa.

METODOS

1. Cepas y condiciones de crecimiento.

Para este estudio fueron utilizadas las cepas de *P. infestans* 1043 (A1 mating type, mitochondrial DNA IIa) and 4084 (A2 mating type, mitochondrial DNA Ia) cuyos aislamientos fueron obtenidos en Colombia de cultivos de *Solanum tuberosum* que presentaban infección (Vargas *et al.*, 2009). Las cepas fueron crecidas en agar rye suplementado con 2 % de sucrosa e incubadas a 17 °C por 8 días en la oscuridad (Goodwin *et al.*, 1998). El micelio, para la extracción de RNA fue crecido por una semana en caldo pea a 19 °C, filtrado al vacío y congelado en nitrógeno líquido.

2. Extracción de ARN y obtención de cDNA

El ARN total, fue extraído a partir de micelio congelado con nitrógeno líquido, por medio del método de extracción fenólica con trizol (Reagent® Invitrogen™ Life Technologies) y la integridad del ARN fue analizada mediante electroforesis en gel de agarosa. La obtención de cDNA se llevó a cabo mediante la retro-transcripción de mRNA con el uso del kit Superscript® III RT (Invitrogen).

3. Clonación y sub-clonación.

El cDNA obtenido mediante retro-transcripción de RNA, fue usado como template para la amplificación por PCR de la secuencia codificante de Aspartato Transcarbamoilasa de *P. infestans* (PiATC). Para la amplificación, fueron utilizados los primers forward (5'TGGCAGGTTGAACGCTCGGTATCCT AGG3') y reverse (5'AGAGCAGGACCCGTTCCGTATCCT AGG3') diseñados a partir de la secuencia de PiATC obtenida mediante el alineamiento, de la secuencia de Aspartato Transcarbamoilasa de *Toxoplasma*

gondii (AF311911.1) y la anotación genómica del Broad Institute [*Phytophthora infestans* T30-4]. Adicionalmente, las secuencias de restricción para la enzima BamHI fueron adicionadas a los primers en su extremo 3'. Posteriormente, el producto de PCR fue confirmado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, poliadenilado y ligado en el vector pGEM®-T Easy (Promega). El plásmido recombinante pGEM-PiATC fue transformado en cepas electro-competentes de *E. coli* DH5αF' (Stratagen). Los plásmidos transformados en *E. coli* DH5αF' fueron extraídos mediante lisis alcalina (Sambrook & Russell, 2001) y confirmados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %. El plásmido recombinante pGEM-PiATC, fue digerido con la enzima de restricción BamHI (NE-BioLabs) al igual que el vector de expresión pET-15b (Novagen) y los productos de digestión fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Los productos de restricción fueron extraídos del gel mediante el uso kit de purificación QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). La secuencia de PiATC obtenida mediante restricción, fue ligado mediante el uso de la DNA T4 ligasa (Invitrogen), al vector de expresión pET-15b (Novagen). El constructo pET-15b-PiATC fue transformado una vez más en *E. coli* DH5αF' mediante quimiocompetencia (Hanahan, 1995).

La correcta dirección del fragmento PiATC en el vector pET-15b, acorde con el marco de lectura fue comprobada mediante restricción con la enzima XbaI y mediante PCR con el uso del primer forward diseñado para la amplificación de PiATC (3'.GGATCCTATGGCTCGCAAGTTGGACGGT.5') y el primer reverse de la polimerasa del fago T7, que generaron fragmentos de longitud variable de acuerdo con la orientación de la secuencia. Por último, el vector pET-15b-PiATC fue transformado en cepas de *E. coli* BL21CodonPlus(DE3)RP mediante electroporación con el uso del Electroporator (BioRad) y los protocolos de expresión fueron desarrollados en este sistema.

4. Expresión y Purificación

Una colonia de *E. coli* BL21CodonPlus(DE3)RP transformada con pET-15b-PiATC fue inoculada en 15 mL de medio LB (Sambrook & Russell, 2001) con 0.1 mg/mL de ampicilina y se incubó overnight a 37

°C y 180 rpm. 12.5 mL de este cultivo y fueron usados como inóculo inicial para 250 mL de medio LB, el cual fue incubado a 37 °C y 180 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.3 a 600 nm. Al alcanzar dicha densidad, la temperatura se redujo a 21 °C y más tarde cuando la densidad óptica alcanzó un valor de 0.6, la inducción fue realizada mediante la adición de Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM. El cultivo fue incubado post-inducción a temperatura ambiente (21 °C) durante 24 h y alícuotas de 1 mL del cultivo fueron recolectadas a las 3, 5, 7 y 24 h. Las alícuotas fueron centrifugadas a 5000 g durante 15 min y los pellets fueron analizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE, 12 % running gel y 5 % stacking gel) usando el sistema de buffer descrito por Laemmli (1970). Las muestras fueron calentadas durante 15 min a 95 °C en loading buffer 5x (275 mM Tris-HCl, 17.5 % glycerol, 0.008 % bromophenol blue, 3 M β-mercaptoethanol and 40 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pH 7.0) y la electroforesis se realizó a 100 V durante 2 h en la celda BioRad Mini-Protean electrophoresis cell, los geles fueron teñidos con el uso de Coomassie Blue R dye.

El cultivo restante incubado post-inducción, fue centrifugado a 5000 g durante 30 min y el pellet fue resuspendido en 20 mL de buffer de sonicación (50 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM NaCl, 10 % glicerol, 1 mM dithiothreitol (DTT) e inhibidores de proteasas adicionados justo antes de la sonicación; 1 mM benzamidine y 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)). La sonicación se llevó a cabo mediante el uso del sonicador Branson 250 analogue sonicator bajo las siguientes condiciones, 8 ciclos de sonicación constante durante 20 seg, power 8 (amplitude 45 %). El producto de la sonicación fue separado mediante centrifugación a 5000 g a 4 °C durante 45 min y cada una de las fracciones fue analizada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) como fue descrito anteriormente.

La purificación de la fracción soluble fue desarrollada mediante cromatografía de afinidad con el uso 1 mL de la columna Ni-NTA (Qiagen) y los siguientes buffer's: buffer de elución (100-500 mM imidazole, 0.75 mM DTT, 300 mM NaCl, 1 %

glycerol); buffer de equilibrado (10 mM imidazole, 0.75 mM DTT, 200 mM NaCl); y buffer de lavado (50 mM imidazol, 0.75 mM DTT, 200 mM NaCl). Se realizaron 4 lavados de 5ml y 5 eluciones de 1ml con concentración de 100, 200, 300, 400 y 500 mM de imidazole. Por último, cada fracción obtenida en la cromatografía fue analizada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) como se describe anteriormente.

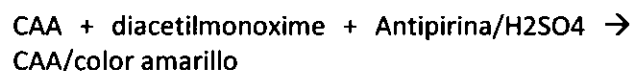
5. *Ensayo de Actividad*

La proteína purificada fue cuantificada con el uso del espectrofotómetro Beckman Coulter DU mediante el método de Bradford (Bio-Rad). La absorbancia fue medida a 595 nm y la curva estándar fue realizada con el uso de bovine serum albumin (BSA). El ensayo de actividad fue desarrollado con el método espectrofotométrico basado en la reacción de los compuestos ureídicos con un reactivo oxima (Prescott & Jones., 1969). ATC cataliza la transferencia del grupo carbamoilo de carbamoilo fosfato (CAP) a L-aspartato (L-ASP) lo que lleva a la producción de L-carbamoilo-L-aspartato (CAA) y fosfato inorgánico (Pi) (Prescott & Jones., 1969) (Ecuación 1). En un medio con ácido sulfúrico, diacetilmonoxima y antipirina, L-carbamoilo-L-aspartato genera un producto de color amarillo donde la absorbancia es mediada a 466nm con el uso del espectrofotómetro (Etchian & Pellerin, 2003) (Ecuación 2). La tasa de producción de CAA fue relacionada con la absorbancia y la cantidad de enzima presente en el medio.

Ecuación 1:



Ecuación 2:



El ensayo fue desarrollado a 37°C durante 10min y la actividad fue iniciada mediante la adición de carbamoilo fosfato a una concentración final de 2.5 mM, en un volumen final de 500 mL de buffer de actividad (30 mM aspartato, 50 mM Tris-HCl pH 8.3, 5 % glicerol, 1 mg/mL BSA) como describen (Mejias & Zimmermann, 2002; Prescott and Jones, 1969). La curva estándar fue construida con el uso

de L-carbamoil-DL-aspartato en concentraciones entre 0 y 300 μ M.

6. Análisis filogenético

Las secuencias aminoacídicas de las diferentes ATC's, para el desarrollo del análisis filogenético preliminar, fueron obtenidas a partir de algunas anotaciones genómicas. La secuencia de PiATC fue obtenida a partir de la anotación genómica del Broad Institute [*Phytophthora infestans* T30-4] usando la herramienta BLASTp y la secuencia query de *Toxoplasma gondii* ATC. Del mismo modo, para la obtención de las secuencias de las diferentes solanáceas y la secuencia de *Oryza Sativa*, se utilizaron las plataformas Sol Genomics Network y Rice Genome Annotation Project y mediante el uso de la herramienta BLASTp y la secuencia query de *Arabidopsis thaliana* ATC las secuencias fueron obtenidas. Las secuencias de las diferentes bacterias y archaeas fueron obtenidas mediante el uso de la herramienta PSI-BLAST del instituto europeo de bioinformática (EMBL-EBI) usando como query la secuencia de la subunidad catalítica de *E. coli* ATC. Las secuencias restantes fueron obtenidas directamente mediante su búsqueda en la plataforma de NCBI (Números de acceso (Fig. 7)).

Las secuencias aminoacídicas fueron alineadas mediante el uso de MAFFT versión 6 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) usando los parámetros por defecto y las secuencias fueron editadas manualmente con el uso de JalView 2 para remover gaps y regiones pobremente alineadas. Mediante el uso del programa TOPALI V.2, fue obtenido el mejor modelo de sustitución, así como el árbol filogenético calculado mediante inferencia bayesiana (modelo de sustitución BLOSSUM, número de corridas: 10, número de generaciones: 1.000.000)

7. Modelaje

La estructura 3D monomérica fue predicha mediante modelaje por homología a través del uso de SWISS-MODEL con parámetros por defecto (Fig. 8A), y el alineamiento entre posibles templados para dicha predicción fue desarrollado mediante el uso de MAFFT versión 6 como se describió previamente (Fig. 9). El trímero catalítico de PiATC

fue construido con el uso de la plataforma ClusPro 2.0, usando como Receptor el monómero predicho por SWISS-MODEL y el parámetro avanzado de Multimer Docking (Beta Versión) con un número de subunidades igual a 3. El mejor modelo fue seleccionado teniendo en cuenta el menor puntaje ponderado, referente a la más baja energía y la visualización de la estructura se realizó con el uso de programa USCF CHIMERA, que permitió la comparación entre las estructuras de los posibles templados. Por último el análisis de la secuencia de PiATC se llevó a cabo con el uso de la plataforma Protein information source (PIR).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Clonación y sub-clonación.

Los plásmidos extraídos a partir de *E. coli* DH5 α F' correspondientes a pGEM-PiATC, mostraron un cambio en su movilidad electroforética, de alrededor de 1000pb en comparación con el vector vacío, lo que sugiere la inserción de la secuencia de PiATC en el vector (Fig. 1A). De igual forma, la inserción de la secuencia fue corroborada mediante PCR con el uso de los primers M13, que generaron un fragmento de alrededor de 1000pb (Fig. 1B) y su posterior secuenciación terminó por validar en un 100 % la inserción de la misma en el vector (Macrogen, Korea) (Anexo 1). La restricción enzimática del vector pGEM-PiATC con la enzima BamHI, permitió la liberación del fragmento correspondiente a PiATC de un tamaño aproximado de 1000 pb (Fig. 2A) el cual posteriormente fue ligado al vector de expresión pET-15b. La inserción de PiATC en el vector pET-15b fue confirmada mediante PCR con el uso de los primers de la polimerasa del fago T7 que generaron una vez más un fragmento de 1000 pb (Fig. 2B), pero solo la restricción enzimática con la enzima XbaI del vector pET-15b-PiATC permitió determinar la correcta orientación del fragmento en el Clon3 (bandas 427 pb y 6245 pb) y la orientación incorrecta del mismo en el Clon 17 (bandas 757 pb y 5915 pb) (Fig. 3A y 4) Resultados que fueron respaldados por la amplificación de los clones, con el uso del primer forward diseñado en este estudio y el primer reverse de la polimerasa del fago T7 (Fig. 3B).

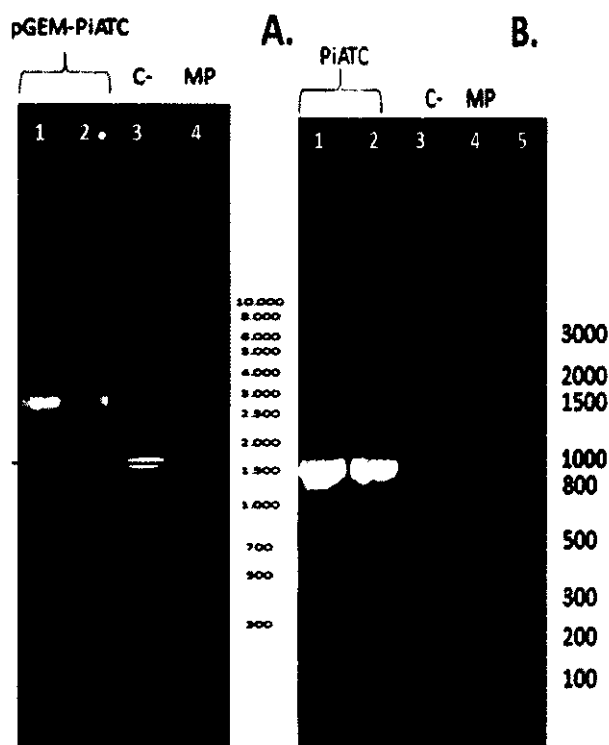


Figura 1. A: Extracción de ADN plasmídico. Carril 1 y 2: *E. coli* DH5 α F transformado con el vector pGEM-PiATC, carril 3 vector pGEM[®]-T Easy (Promega) vacío, carril 4: Axygen Biosciences 1kb Ladder. **B:** Productos de PCR usando primers M13 y teniendo como templado pGEM-PiATC. Carril 1 y 2: pGEM-PiATC, carril 3: control negativo, carril 4: Axygen Biosciences 3000bp Ladder.

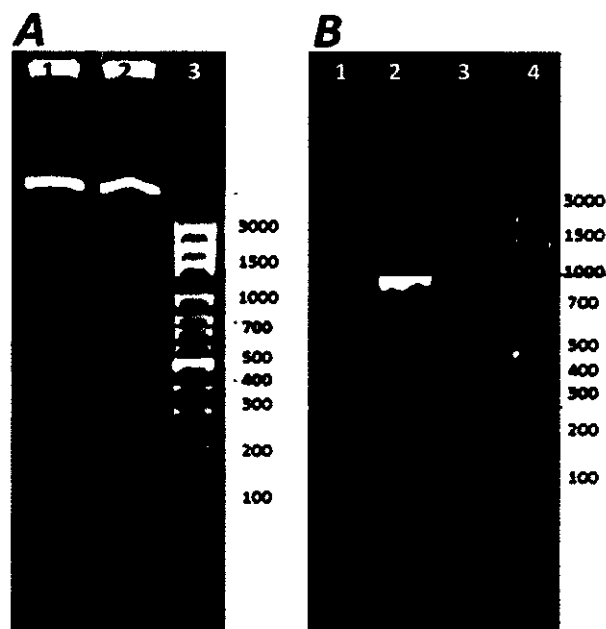


Figura 3. A: restricción enzimática de pET-15b-PiATC con la enzima XbaI. Carril 1: pET-15b-PiATC Clon 3 (Orientación correcta), carril 2: pET-15b-PiATC Clon 17 (Orientación incorrecta), carril 3: Axygen Biosciences 3000bp Ladder. **B:** Producto de PCR usando el primer forward de PiATC diseñado en este estudio y el primer reverse de la polimerasa del fago T7; y teniendo como templado pET-15b-PiATC. Carril 1: control negativo, carril 2: pET-15b-PiATC Clon 3 (Orientación correcta), carril 3: pET-15b-PiATC Clon 17 (Orientación incorrecta), carril 4: Axygen Biosciences 3000bp Ladder

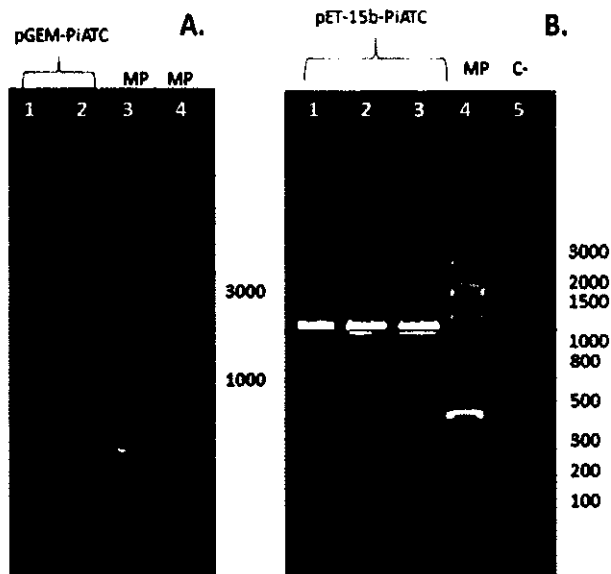


Figura 2. A: restricción enzimática de pGEM-PiATC con la enzima BamHI. Carril 1 y 2: pGEM-PiATC digerido con BamHI, carril 3: Axygen Biosciences 3000 pb Ladder, carril 4: Axygen Biosciences 1kb Ladder. **B:** Producto de PCR usando los primers de la polimerasa del fago T7 y teniendo como templado pET-15b-PiATC. Carril 1, 2 y 3: pET-15b-PiATC, carril 3: Axygen Biosciences 3000 pb Ladder, carril 4: control negativo.

2. Expresión y Purificación

La sobre expresión de la proteína recombinante (PiATC) a partir de *E. coli* BL21CodonPlus(DE3)RP transformada con el vector pET-15b-PiATC (Clon3), fue posible mediante su inducción con IPTG. La proteína mostro un peso aproximado de 39 kDa y la sobre expresión fue estable a partir de la 3h post-inducción (Fig. 5A). Los protocolos de sonicación y el posterior análisis mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de cada una de las fracciones, permitió la detección de PiATC en el sobrenadante o fracción soluble de la muestra (Fig. 5B) lo que hizo más sencilla la purificación de la enzima. La purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad con el uso de la columna Ni-NTA fue altamente eficiente (Fig. 6) debido a que la cuantificación de la proteína, mediante el método de Bradford después de la purificación, permitió determinar un rendimiento aproximado de 7 mg de proteína recombinante por litro de cultivo.

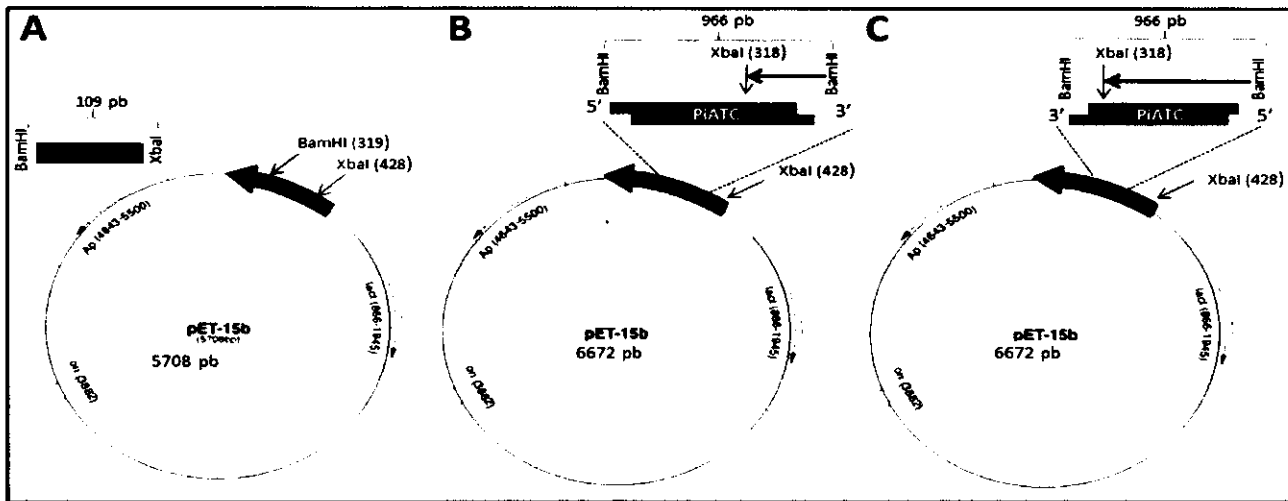


Figura 4: esquema de restricción enzimática del constructo pET-15b-PiATC con la enzima XbaI. A: Vector de expresión pET-15b. B: Restricción de pET-15b-PiATC orientación correcta (Clon 3). C: Restricción de pET-15b-PiATC orientación incorrecta (Clon 17)

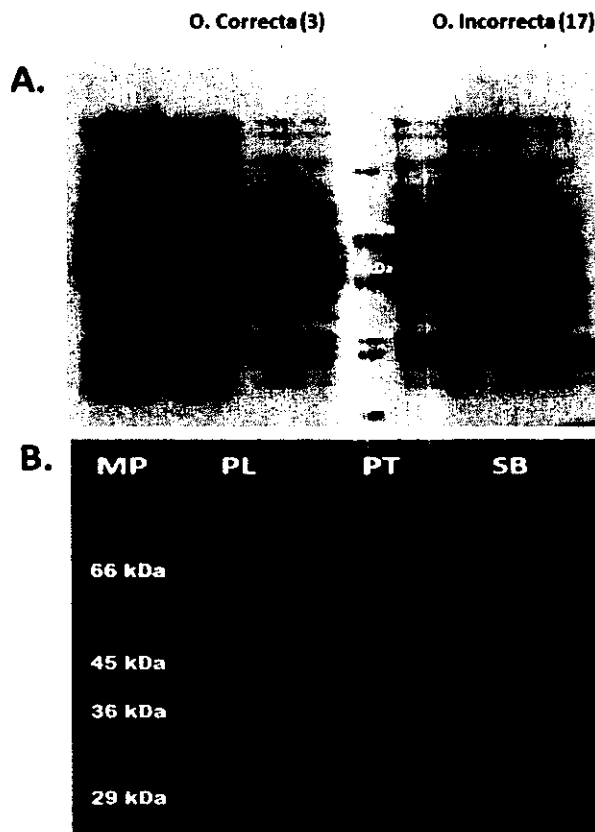


Figura 5. A: Inducción de PiATC a partir del vector pET-15b-PiATC transformado en *E. coli* BL21CodonPlus(DE3)RP. Carril 1, 2, 3, 5: Inducción durante 3h, 5h, 7h y 24h del clon en orientación correcta, carril 4: Fermentas PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, carril 6: Inducción durante 24h del clon en orientación incorrecta. B: Ensayo de solubilidad de PiATC (8 ciclos de 20seg de sonicación constante, power 8 (amplitud 45%)). Carril 1: Fermentas PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, carril 2: pellet, carril 3: proteína total, carril 4: sobrenadante.

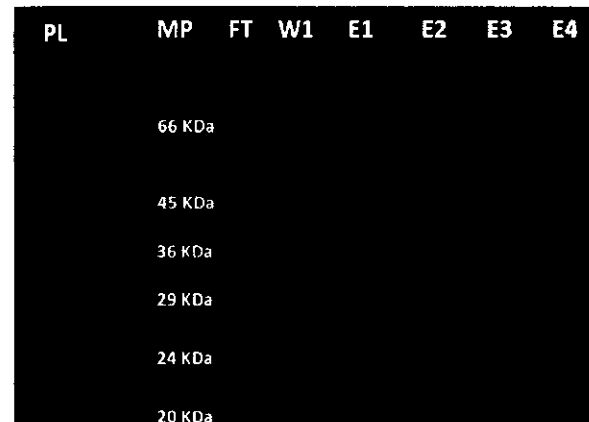


Figura 6. Purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad. Carril 1: Pellet, carril 3: Fermentas PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, carril 4, Flowthrough, carril 5: lavado 1 (50mM imidazole), carril 6: elución 1 (100mM imidazole), carril 7: elución 2 (200mM imidazole), carril 8: elución 3 (300mM imidazole), carril 9: elución 4 (400mM imidazole).

3. Ensayo de Actividad

La actividad específica de PiATC estimada mediante el ensayo colorimétrico que permite la detección de L-carboamil-DL-aspartato, mostro un valor aproximado de 340 $\mu\text{MCAA}/\text{h}\cdot\text{mgATC}$, el cual es un valor relativamente bajo en comparación con la actividades específicas de las ATC's de organismos filogenéticamente cercanos (Tabla 1). Sin embargo, es importante tener en cuenta que la actividad específica de PiATC puede verse afecta por el Tag de histidinas otorgado por el vector de expresión pET-15b, que facilita la purificación de la misma, por lo que ensayos adicionales sin la presencia de dicho Tag son necesarios.

Tabla 1: comparación de la actividad específica de diferentes ATC filogenéticamente cercanas a PiATC

	Actividad específica uMCAA/h*mgATC	Referencia
<i>Toxoplasma gondii</i>	23.900	(Mejias & Zimmermann, 2002)
<i>Trypanosoma cruzi</i>	540	(Hill et al., 1980)
<i>Pyrococcus abyssy</i>	2.900	(Boxstael et al., 2005)
<i>P. infestans</i>	340	

4. Análisis filogenético

El análisis filogenético preliminar realizado mediante inferencia bayesiana con el uso del programa TOPALi V.2, permitió evidenciar la relativamente distante relación filogenética entre la ATC de *P. infestans* y las ATC's de *S. tuberosum* y de *H. sapiens*, lo cual es una característica deseable en el momento de diseñar inhibidores especie-específicos, ya que esto sugiere que por efecto de sus diferencias los inhibidores diseñados contra *P. infestans* podrían no tener efecto sobre el hospedero o consumidor (Fig. 7). De igual forma, este análisis también permitió evidenciar la estrecha relación filogenética que presentan los *Apicomplexa* y los *Oomycota*, lo que respalda nuestra hipótesis de la posible funcionalidad de las estrategias utilizadas para el control de los *Apicomplexa* en los *Oomycota* (Fig. 7). Los anteriores resultados fueron similares a los

encontrados por García et al., 2012. Sin embargo, es importante tener en cuenta, que los residuos del sitio catalítico de las diferentes ATC's analizadas se encuentra muy conservados en comparación con PiATC lo que hace más difícil el diseño de inhibidores especie específicos.

5. Modelaje

El análisis de la estructura 3D realizado mediante homología con SWISS-MODEL predijo un monómero catalítico, a partir de la estructura de *P. abyssy* (Fig. 8A). La secuencia de *P. abyssy* mostró una alta similaridad con la secuencia de *P. infestans* de forma global y los residuos del sitio catalítico se mostraron 100% conservados a diferencia de otras ATC, por lo que esta predicción podría resultar la más probable (Fig. 8C y 9). Adicionalmente la estructura multimerica de PiATC predicha con el uso de ClusPro 2.0 usando como Receptor el monómero predicho por SWISS-MODEL, arrojó un trímero como la estructura más probable (Fig. 8B). Por lo tanto teniendo en cuenta la anterior información y la carencia de PiATC de una subunidad regulatoria, muy probablemente PiATC podría ser en un trímero catalítico no regulado, muy parecido al de bacterias como *Bacillus subtilis*, aunque análisis adicionales son requeridos para una total certeza.

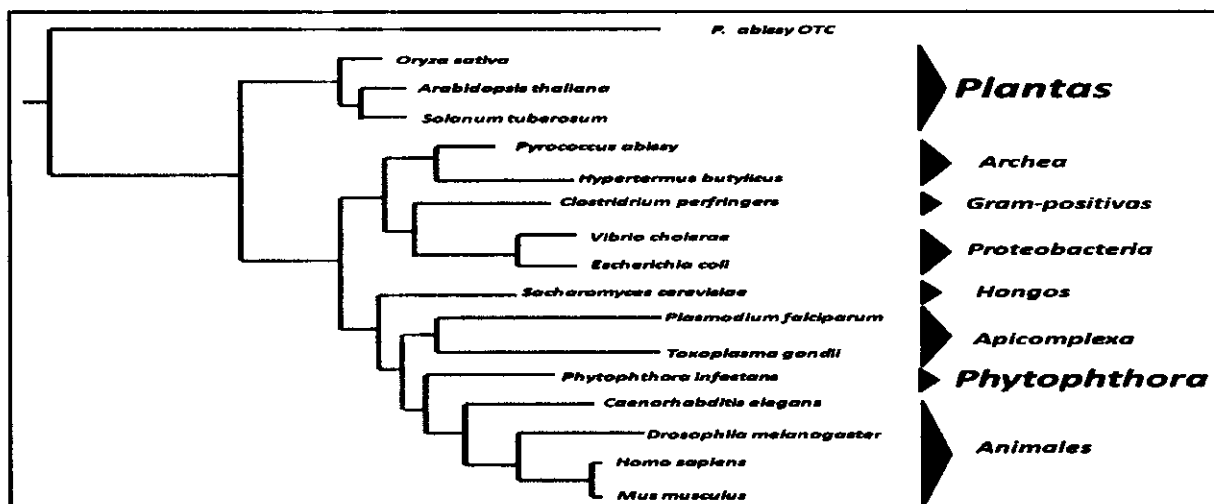


Figura 7: Análisis filogenético de aspartato transcarbamoilasa (ATC) mediante inferencia bayesiana, con el uso del programa TOPALi V.2: modelo de sustitución BLOSSUM, número de corridas: 10, número de generaciones: 1.000.000. *Arabidopsis thaliana* (CAA50687), *Solanum tuberosum* (CAC85728), *Oryza sativa* (NP_001061367), *Homo sapiens* (AAA51907), *Mus musculus* (AAH43325), *Drosophila melanogaster* (NP_523377), *Sacharoomyces cerevisiae* (AAA35198), *Toxoplasma gondii* (AAL74315), *Plasmodium falciparum* (XP_001350162), *Pyrococcus abyssy* (NP_127002), *Caenorhabditis elegans* (NP_495838), *Vibrio cholera* (ZP_04402900), *Clostridium perfringers* (YP_698523), *Escherichia coli* (NP_313249), *Phytophthora infestans* (XP_002904952).

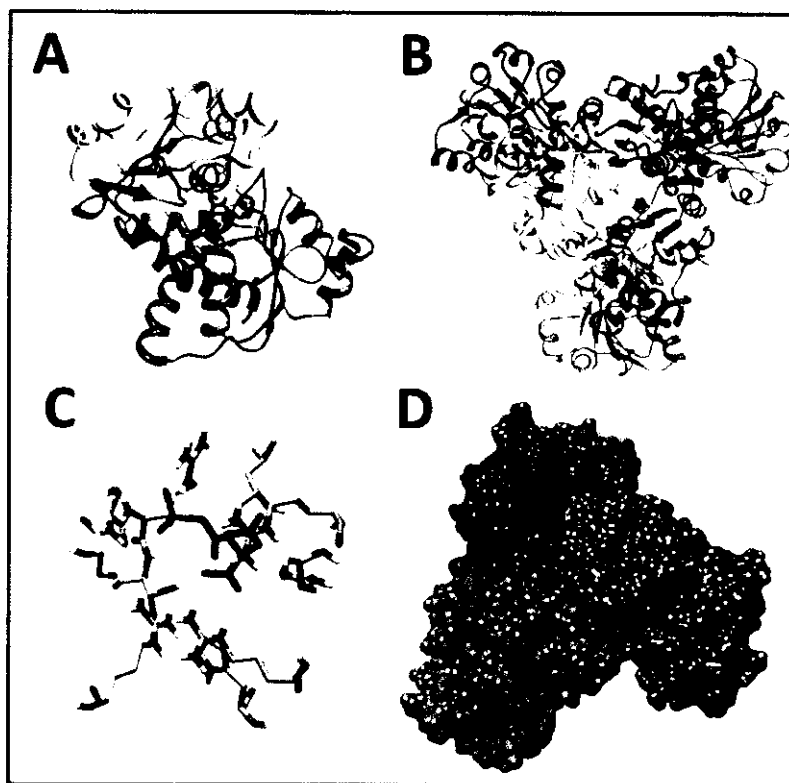


Figura 8. A: predicción monomérica de PiATC mediante el uso de SWISS-MODEL (Templado: *Pyrococcus abyssy* (PDB: 1ml4), identidad de secuencia: 50.49, E-value: 0.00e-1, QMEAN Z-Score: -1.25). B y D: Ensamblaje del trímero catalítico de PiATC a través del uso de ClusPro 2.0 (Weighted score center: -454.1, Weighted score lowest energy: -667.2). C: residuos catalíticos del monómero de PiATC Ser90-Thr91-Arg92-Thr93-Arg141-His169-Arg205-Arg266-Gln268-Leu305 (Ligando PALA sobrepuesto ATC de *E. coli* (PDB: 1d09)).

Conclusiones

Fue posible la clonación, expresión y purificación de PiATC. La proteína mostró un peso aproximado de 39KDa y alcanzó un rendimiento máximo 7mg por litro de cultivo. La actividad específica de la enzima PiATC se mostró baja en comparación con valores de ATC's de organismos filogenéticamente cercanos con un valor de 340 μ MCAA/ h \cdot mgATC. Por otro lado, los análisis nativos de movilidad electroforética junto con el modelaje y posterior docking molecular de PiATC sugieren un trímero catalítico como la estructura cuaternaria más probable.

Por último, teniendo en cuenta que los análisis de este estudio fueron desarrollados con el fin, de evaluar el potencial de PiATC como blanco para el control de *P. infestans* a través del bloqueo de ruta de síntesis de novo de pirimidinas, es consecuente

concluir, que PiATC cuenta con algunas características deseables para tal fin, como su distante relación filogenética con las ATC's de *S. tuberosum* y de *H. sapiens*, pero la evaluación de inhibidores sobre las dos ATC's (PiATC y STATC) es necesaria para determinar su verdadero potencial. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el bloqueo de una única enzima no es suficiente, por lo que se requiere una inhibición conjunta de varias enzimas que generen un efecto sinérgico capaz de inhibir la ruta completa.

Agradecimientos

Mis más sinceros agradecimientos a las doctoras Bárbara Zimmermann y Silvia Restrepo por permitirme participar en este proyecto, a Juan José Vázquez por haberme permitido el uso del clon de PiATC y a todos los demás miembros del BBMP y LAMFU por toda su colaboración, apoyo y consejo.

Doy las gracias también a Manuel Garavito y Heidy Narváez, a quienes considero grandes investigadores y tutores; así como a Consuelo Rocha por su ayuda incondicional con los ensayos de actividad. Por último agradezco

al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (Colciencias) ya que su financiación permitió el desarrollo de esta investigación.

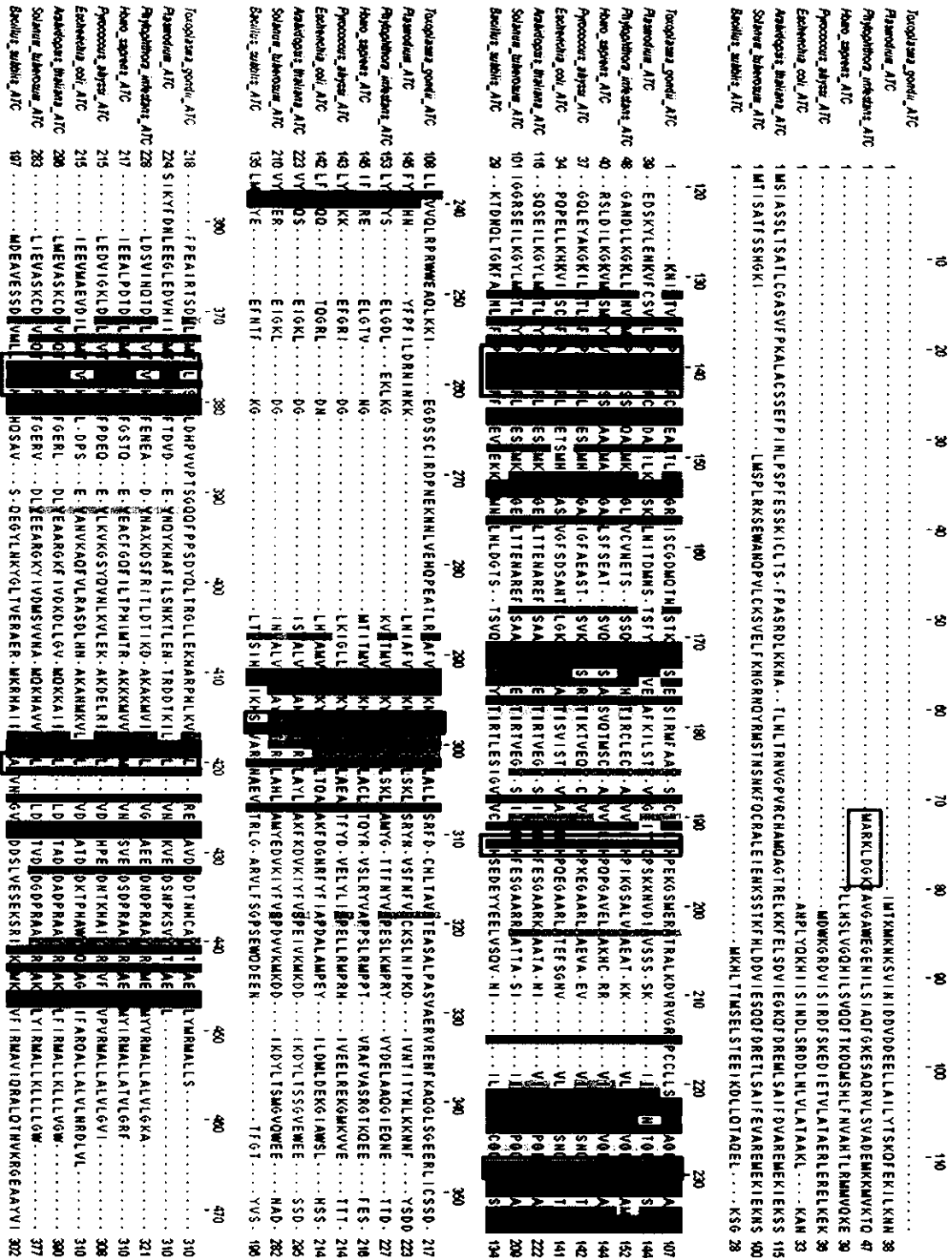


Figura 9. Alineamiento múltiple entre las secuencia aminoácidas de las diferentes ATC. Cajas rojas: residuos de sitio catalítico, Caja verde: sitio de unión a ATP. El porcentaje de identidad, se presenta en función del color azul.

REFERENCIAS

1. Attard, A., M. Gourgues, et al. (2008). "Strategies of attack and defense in plant-oomycete interactions, accentuated for *Phytophthora parasitica* Dastur (syn. *P. Nicotianae* Breda de Haan)." *Journal of Plant Physiology* 165(1): 83-94. PMID: 17766006
2. Boxstael, S., Cunin, R., Khan, S & Maes, D. (2005). Aspartate transcarbamylase from Hyperthermophilic archeon *Pyrococcus abyssus*. *FEBS Journal* 272: 2670-6683
3. Buysens, S., K. Heungens, et al. (1996). "Involvement of Pyochelin and Pyoverdine in Suppression of Pythium-Induced Damping-Off of Tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2." *Appl. Environ. Microbiol.* 62(3): 865-871.
4. Bradford, 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(1-2): 248-254.
5. Carreño N, Vargas A, Bernal A, Restrepo S. (2007). "Problemas fitopatológicos en especies de la familia Solanaceae causados por los géneros *Phytophthora*, *Alternaria* y *Ralstonia* en Colombia." *Agron. colomb.* vol.25 no.2 Bogotá July/Dec
6. Clark MC, Melanson DL, Page OT; Purine metabolism and differential inhibition of spore germination in *Phytophthora infestans*; *Can J Microbiol.* 1978 Sep; 24(9):1032-8; PMID: 709431
7. Evans, D. R. and H. I. Guy (2004). "Mammalian Pyrimidine Biosynthesis: Fresh Insights into an Ancient Pathway." *Journal of Biological Chemistry* 279(32): 33035-33038. PMID: 15096496
8. Geigenberger P, Regierer B, Nunes-Nesi A, Leisse A, Urbanczyk-Wochniak E, Springer F, van Dongen JT, Kossmann J, Fernie AR; 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.* 2005 Jul; 17(7):2077-88. Epub 2005 Jun 10; PMID: 15951490
9. Goodwin SB, Smart CD, Sandrock RW, Deahl KL, Punja ZK, Fry WE; Genetic Change Within Populations of *Phytophthora infestans* in the United States and Canada During 1994 to 1996: Role of Migration and Recombination; *Phytopathology.* 1998 Sep;88(9):939-49; PMID: 18944872
10. Haldar, K., S. Kamoun, et al. (2006). "Common infection strategies of pathogenic eukaryotes." *Nat Rev Micro* 4(12): 922-931. PMID: 17088934
11. Hanahan, D., Jessee, J. & Bloom, F. Techniques for transformation of *E. coli* (1995). *DNA Cloning 1: Core Techniques-A Practical Approach*: 1.
12. Hill, B., Kilsby, J., Rogerson G.W., McIntosh, R.T., Ginger, C.D. (1980). The enzymes of pyrimidine biosynthesis in a range of parasitic protozoa and helminthes. *Molecular and Biochemical Parasitology.* Volume 2, Issues 3-4, 1981, Pages 123-134
13. Hyde, J. (2007). "Targeting purine and pyrimidine metabolism in human apicomplexan parasites." *Current drug targets* 8(1): 31-47. PMID: 17266529
14. Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227:680-5.
15. Lamour, K. H., J. Win, et al. (2007). "Oomycete genomics: new insights and future directions." *FEMS Microbiology Letters* 274(1): 1-8. PMID: 17559387
16. Li, Y. and F. M. Raushel (2005). "Inhibitors designed for the active site of dihydroorotase." *Bioorganic Chemistry* 33(6): 470-483.
17. Martens C, Vandepoele K, Van de Peer Y; Whole-genome analysis reveals molecular innovations and evolutionary transitions in chromalveolate species; *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Mar 4;105 (9):3427-32; PMID: 18299576
18. Mejias-Torres IA, Zimmermann BH. (2002). Molecular cloning, recombinant expression and partial characterization of the aspartate transcarbamoylase from *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol.* 119(2):191-201. PMID: 11814571.
19. Nicholls H; Stopping the rot; *PLoS Biol.* 2004 Jul;2(7):E213; PMID: 15252456
20. Prescott, L & Jones M. (1969). Modified methods for the determination of carbamyl aspartate. *Anal Biochem* 32:408-19. PMID: 5361395.
21. Sambrook, J & Russell DW. (2001), *Molecular Cloning: A laboratory manual.* 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
22. Vargas AM, Quesada Ocampo LM, Céspedes MC, Carreño N, González A, Rojas A, Zuluaga AP, Myers K, Fry WE, Jiménez P, Bernal AJ, Restrepo S; Characterization of *Phytophthora infestans* populations in Colombia: first report of the A2 mating type; *Phytopathology.* 2009 Jan; 99(1):82-8; PMID: 19055438
23. Washabaugh, M. and K. Collins (1984). "Dihydroorotase from *Escherichia coli*: purification and characterization." *Biological chemistry* 259(5): 3293-3298.

**SISTEMA DE BIBLIOTECAS
IDENTIFICACIÓN TRABAJO DE GRADO**

FECHA DE ELABORACIÓN		
DD	MM	AAAA
03	07	2012

1. IDENTIFICACIÓN AUTOR(ES) DEL TRABAJO DE GRADO

CÓDIGO	DOCUMENTO DE IDENTIDAD		APELLIDOS	NOMBRES	CORREO ELECTRÓNICO
	TIPO	NÚMERO			
200814881	CC	1018439050	Bello Rodríguez	Julian Camilo	jc.bello131@uniandes.ed
	CC				
	CC				
	CC				
	CC				
	CC				

PROGRAMA FACULTAD DEPARTAMENTO **ENTREGÓ FORMATO:**

- SB-10 "Entrega trabajo de grado y autorización de uso a favor de la Universidad de los Andes".
- SB-10: Documento con el cual, el autor permite que su trabajo sea utilizado por la Universidad, para fines de consulta y de mención en sus catálogos bibliográficos, tanto físicos como en línea.

1.1 IDENTIFICACION DE TRABAJO DE GRADO PARA DOBLE TITULACIÓNPROGRAMA FACULTAD DEPARTAMENTO **TESIS PARA DOBLE TITULACIÓN:**

- Si el trabajo de grado presentado aplica para obtener dos (2) titulaciones, por favor marque esta casilla y diligencie la información de esta sección.

2. INFORMACIÓN GENERAL DEL TRABAJO DE GRADO

TÍTULO DEL TRABAJO DE GRADO:

Caracterización preliminar de Aspartato transcarbamoilasa (ATC) de *Phytophthora infestans*.**DESCRIPCIÓN FÍSICA**Número de páginas: Ilustraciones: **MATERIAL ACOMPAÑANTE (Cantidad):**Casetes Audio: Casetes Video: Disquetes: Discos compactos: Diapositivas: Otros: ¿Cuáles? **FECHA DE ELABORACIÓN**

DD	MM	AAAA
03	07	2012

***RESUMEN DEL TRABAJO DE GRADO:**

Aspartato transcarbamoilasa (ATC) y en general la ruta completa de síntesis de novo de pirimidinas es considerada como un blanco potencial para el control de parásitos pertenecientes al Phylum Apicomplexa, así como para el control de fitopatógenos de la clase Oomycota, quienes anualmente causan millonarias pérdidas en agricultura a nivel mundial. Sin embargo, ATC nunca ha sido estudiada en fitopatógenos pertenecientes al género *Phytophthora*, por lo que este trabajo desarrolla una caracterización preliminar de la Aspartato transcarbamoilasa de *Phytophthora infestans* (PiATC). Un análisis filogenético preliminar, desarrollado mediante inferencia bayesiana, mostró el potencial de PiATC como blanco para el control de *P. infestans*, debido a la distante relación filogenética que esta presenta con respecto a la proteína StATC de su hospedero *S. tuberosum*. La clonación y expresión proteica se llevó a cabo a partir del vector de expresión pET-15b-PiATC transformado mediante electroporación en *E. coli* BL21CodonPlus(DE3)RP. La proteína mostró un peso aproximado de 39KDa acorde con lo esperado y fue expresada en forma soluble mediante su inducción con IPTG. La producción de la proteína recombinante alcanzó un rendimiento máximo 7mg por litro de cultivo, y su purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad con el uso de la columna Ni-NTA (Qiagen). La actividad específica de la enzima PiATC mostró un valor de 340 μ MCAA/h \cdot mgATC, el cual es un valor bastante bajo en comparación con los valores de las ATC's de organismos filogenéticamente cercanos. Por último, modelaje y posterior docking molecular de PiATC sugieren un trimero catalítico como la estructura cuaternaria más probable.

OBJETIVOS DEL TRABAJO DE GRADO:

Este trabajo tiene como objetivo generar la caracterización molecular y bioquímica de la enzima Aspartato Transcarbamoilasa de *Phytophthora infestans* (PiATC) con el fin de evaluar su potencial como blanco para la inhibición de la síntesis de novo de pirimidinas, a través del uso de inhibidores especie específicos, que permitan controlar el tizón tardío de la papa.

METODOLOGÍA DEL TRABAJO DE GRADO:

MÉTODOS

1. Cepas y condiciones de crecimiento.

Para este estudio fueron utilizadas las cepas de *P. infestans* 1043 (A1 mating type, mitochondrial DNA IIa) and 4084 (A2 mating type, mitochondrial DNA Ia) cuyos aislamientos fueron obtenidos en Colombia de cultivos de *Solanum tuberosum* que presentaban infección (Vargas et al., 2009). Las cepas fueron crecidas en agar rye suplementado con 2 % de sucrosa e incubadas a 17 °C por 8 días en la oscuridad (Goodwin et al., 1998). El micelio, para la extracción de RNA fue crecido por una semana en caldo pea a 19 °C, filtrado al vacío y congelado en nitrógeno líquido.

2. Extracción de ARN y obtención de cDNA

El ARN total, fue extraído a partir de micelio congelado con nitrógeno líquido, por medio del método de extracción fenólica con trizol (Reagent® Invitrogen™ Life Technologies) y la integridad del ARN fue analizada mediante electroforesis en gel de agarosa. La obtención de cDNA se llevó a cabo mediante la retro-transcripción de mRNA con el uso del kit Superscript® III RT (Invitrogen).

3. Clonación y sub-clonación.

El cDNA obtenido mediante retro-transcripción de RNA, fue usado como templado para la amplificación por PCR de la secuencia codificante de Aspartato Transcarbamoilasa de *P. infestans* (PiATC). Para la amplificación, fueron utilizados los primers forward (5'TGGCAGTTGACGCTCGGTATCCT AGG3') y reverse (5'AGAGCAGGACCGTTCGGTATTCCT AGG3') diseñados a partir de la secuencia de PiATC obtenida mediante el alineamiento, de la secuencia de Aspartato Transcarbamoilasa de *Toxoplasma gondii* (AF311911.1) y la anotación genómica del Broad Institute [*Phytophthora infestans* T30-4]. Adicionalmente, las secuencias de restricción para la enzima BamHI fueron adicionadas a los primers en su extremo 3'. Posteriormente, el producto de PCR fue confirmado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, poliadenilado y ligado en el vector pGEM®-T Easy (Promega). El plásmido recombinante pGEM-PiATC fue transformado en cepas electro-competentes de *E. coli* DH5αF' (Stratagen). Los plásmidos transformados en *E. coli* DH5αF' fueron extraídos mediante lisis alcalina (Sambrook & Russell, 2001) y confirmados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %. El plásmido recombinante pGEM-PiATC, fue digerido con la enzima de restricción BamHI (NE-BioLabs) al igual que el vector de expresión pET-15b (Novagen) y los productos de digestión fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Los productos de restricción fueron extraídos del gel mediante el uso kit de purificación QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). La secuencia de PiATC obtenida mediante restricción, fue ligada mediante el uso de la DNA T4 ligasa (Invitrogen), al vector de expresión pET-15b (Novagen). El constructo pET-15b-PiATC fue transformado una vez mas en *E. coli* DH5αF' mediante quimiocompetencia (Hanahan, 1995). La correcta dirección del fragmento PiATC en el vector pET-15b, acorde con el marco de lectura fue comprobada mediante restricción con la enzima XbaI y mediante PCR con el uso del primer forward diseñado para la amplificación de PiATC (3'.GGATCCTATGGCTCGCAAGTTGGACGGT.5') y el primer reverse de la polimerasa del fago T7, que generaron fragmentos de longitud variable de acuerdo con la orientación de la secuencia. Por último, el vector pET-15b-PiATC fue transformado en cepas de *E. coli* BL21CodonPlus(DE3)RP mediante electroporación con el uso del Electroporator (BioRad) y los protocolos de expresión fueron desarrollados en este sistema.

4. Expresión y Purificación

Una colonia de *E. coli* BL21CodonPlus(DE3)RP transformada con pET-15b-PiATC fue inoculada en 15 mL de medio LB (Sambrook & Russell, 2001) con 0.1 mg/mL de ampicilina y se incubó overnight a 37 °C y 180 rpm. 12.5 mL de este cultivo y fueron usados como inóculo inicial para 250 mL de medio LB, el cual fue incubado a 37 °C y 180 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.3 a 600 nm. Al alcanzar dicha densidad, la temperatura se redujo a 21 °C y más tarde cuando la densidad óptica alcanzo un valor de 0.6, la inducción fue realizada mediante la adición de Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM. El cultivo fue incubado post-inducción a temperatura ambiente (21 °C) durante 24 h y alícuotas de 1 mL del cultivo fueron recolectadas a las 3, 5, 7 y 24 h. Las alícuotas fueron centrifugadas a 5000 g durante 15 min y los pellets fueron analizados mediante electroforesis en geles de poli-acrilamida (SDS-PAGE, 12 % running gel y 5 % stacking gel) usando el sistema de buffer descrito por Laemmli (1970). Las muestras fueron calentadas durante 15 min a 95 °C en loading buffer 5x (275 mM Tris-HCl, 17.5 % glycerol, 0.008 % bromophenol blue, 3 M β-mercaptoethanol and 40 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pH 7.0) y la electroforesis se realizó a 100 V durante 2 h en la celda BioRad Mini-Protean electrophoresis cell, los geles fueron teñidos con el uso de Coomassie Blue R dye.

El cultivo restante incubado post-inducción, fue centrifugado a 5000 g durante 30 min y el pellet fue resuspendido en 20 mL de buffer de sonicación (50 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM NaCl, 10 % glicerol, 1 mM dithiothreitol (DTT) e inhibidores de proteasas adicionados justo antes de la sonicación; 1 mM

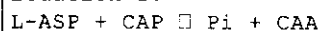
benzamidine y 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)). La sonicación se llevo a cabo mediante el uso del sonicador Branson 250 analogue sonicator bajo las siguientes condiciones, 8 ciclos de sonicación constante durante 20 seg, power 8 (amplitude 45 %). El producto de la sonicación fue separado mediante centrifugación a 5000 g a 4 °C durante 45 min y cada una de las fracciones fue analizada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) como fue descrito anteriormente.

La purificación de la fracción soluble fue desarrollada mediante cromatografía de afinidad con el uso 1 mL de la columna Ni-NTA (Qiagen) y los siguientes buffer's: buffer de elusión (100-500 mM imidazole, 0.75 mM DTT, 300 mM NaCl, 1 % glycerol); buffer de equilibrado (10 mM imidazole, 0.75 mM DTT, 200 mM NaCl); y buffer de lavado (50 mM imidazol, 0.75 mM DTT, 200 mM NaCl). Se realizaron 4 lavados de 5ml y 5 eluciones de 1ml con concentración de 100, 200, 300, 400 y 500 mM de imidazole. Por último, cada fracción obtenida en la cromatografía fue analizada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) como se describe anteriormente.

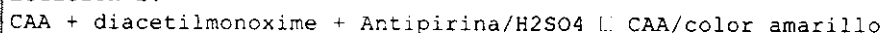
5. Ensayo de Actividad

La proteína purificada fue cuantificada con el uso del espectofotometro Beckman Coulter DU mediante el método de Bradford (Bio-Rad). La absorbancia fue medida a 595 nm y la curva estándar fue realizada con el uso de bovine serum albumin (BSA). El ensayo de actividad fue desarrollado con el método espectofotometrico basado en la reacción de los compuestos ureidicos con un reactivo oxima (Prescott & Jones., 1969). ATC cataliza la transferencia del grupo carbamoil de carbamoil fosfato (CAP) a L-aspartato (L-ASP) lo que lleva a la producción de L-carbamoil-l-aspartato (CAA) y fosfato inorgánico (Pi) (Prescott & Jones., 1969) (Ecuación 1). En un medio con ácido sulfúrico, diacetilmonoxima y antipirina, L-carbamoil-l-aspartato genera un producto de color amarillo donde la absorbancia es medida a 466nm con el uso del espectofotometro (Etchian & Pellerin, 2003) (Ecuación 2). La tasa de producción de CAA fue relacionada con la absorbancia y la cantidad de enzima presente en el medio.

Ecuación 1:



Ecuación 2:



El ensayo fue desarrollado a 37°C durante 10min y la actividad fue iniciada mediante la adición de carbamoil fosfato a una concentración final de 2.5 mM, en un volumen final de 500 mL de buffer de actividad (30 mM aspartato, 50 mM Tris-HCl pH 8.3, 5 % glicerol, 1 mg/mL BSA) como describen (Mejias & Zimmermann, 2002; Prescott and Jones, 1969). La curva estándar fue construida con el uso de L-carbamoil-DL-aspartato en concentraciones entre 0 y 300 uM.

6. Análisis filogenético

Las secuencias aminoacídicas de la diferentes ATC's, para el desarrollo del análisis filogenético preliminar, fueron obtenidas a partir de algunas anotaciones genómicas. La secuencia de PiATC fue obtenida a partir de la anotación genómica del Broad institute [Phytophthora infestans T30-4] usando la herramienta BLASTp y la secuencia query de Toxoplasma gondii ATC. Del mismo modo, para la obtención de las secuencias de las diferentes solanáceas y la secuencia de Oryza Sativa, se utilizaron las plataformas Sol Genomics Network y Rice Genome Annotation Project y mediante el uso de la herramienta BLASTp y la secuencia query de Arabidopsis thaliana ATC las secuencias fueron obtenidas. Las secuencias de las diferentes bacterias y archaeas fueron obtenidas mediante el uso de la herramienta PSI-BLAST del instituto europeo de bioinformática (EMBL-EBI) usando como query la secuencia de la subunidad catalítica de E. coli ATC. Las secuencias restantes fueron obtenidas

Fue posible la clonación, expresión y purificación de PiATC. La proteína mostró un peso aproximado de 39KDa y alcanzó un rendimiento máximo 7mg por litro de cultivo. La actividad específica de la enzima PiATC se mostró baja en comparación con valores de ATC's de organismos filogenéticamente cercanos con un valor de 340 uMCAA/h·mgATC. Por otro lado, los análisis nativos de movilidad electroforética junto con el modelaje y posterior docking molecular de PiATC sugieren un trimero catalítico como la estructura cuaternaria más probable.

Por último, teniendo en cuenta que los análisis de este estudio fueron desarrollados con el fin, de evaluar el potencial de PiATC como blanco para el control de *P. infestans* a través del bloqueo de ruta de síntesis de novo de pirimidinas, es consecuente concluir, que PiATC cuenta con algunas características deseables para tal fin, como su distante relación filogenética con las ATC's de *S. tuberosum* y de *H. sapiens*, pero la evaluación de inhibidores sobre las dos ATC's (PiATC y STATC) es necesaria para determinar su verdadero potencial. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el bloqueo de una única enzima no es suficiente, por lo que se requiere una inhibición conjunta de varias enzimas que generen un efecto sinérgico capaz de inhibir la ruta completa.

***PALABRAS CLAVES (TEMAS) DEL TRABAJO DE GRADO:**

Aspartato transcarbamoylase, Fitopatógeno, Síntesis de novo de pirimidinas, *Phytophthora infestans*, Oomycota, Actividad específica

ACUERDOS DE CONFIDENCIALIDAD: NO TIENE ACUERDO(S) TIENE ACUERDO(S)

Si selecciona tener acuerdo de confidencialidad, por favor diligencie el siguiente cuadro:

Persona natural o jurídica	Desde			Hasta		
	DD	MM	AAAA	DD	MM	AAAA

3. FIRMAS

AUTORES (Nombre completo)

*FIRMAS

Julian Camilo Bello Rodriguez

Julian C. Bello R.

DIRECTORES / ASESORES (Nombre completo)

*FIRMAS

Barbara Hanna Zimmermann

B. H. Zimmermann

Silvia Restrepo Restrepo

SR

JURADO / LECTOR (Nombre completo)

*FIRMAS



Departamento de
Ciencias Biológicas
SECRETARIA



ENTREGA EJEMPLAR TRABAJO DE GRADO Y AUTORIZACIÓN DE SU USO A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

Yo Julian Camilo Bello Rodriguez, mayor de edad, vecino de Bogotá D.C., identificado con la Cédula de Ciudadanía N° 1018439050 de Bogotá D.C., actuando en nombre propio, en mi calidad de autor del trabajo de tesis, monografía o trabajo de grado denominado: Caracterización preliminar de Aspartato transcarbamoilasa (ATC) de Phytophthora infestans.

Yo, Julian Camilo Bello Rodriguez, hago entrega del ejemplar respectivo y de sus anexos del ser el caso, en formato digital o electrónico (CD-ROM) y autorizo a LA UNIVERSIDAD DE LOS ANDES, para que en los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia, utilice y use en todas sus formas, los derechos patrimoniales de reproducción, comunicación pública, transformación y distribución (alquiler, préstamo público e importación) que me corresponden como creador de la obra objeto del presente documento. PARÁGRAFO: La presente autorización se hace extensiva no sólo a las facultades y derechos de uso sobre la obra en formato o soporte material, sino también para formato virtual, electrónico, digital, óptico, usos en red, internet, extranet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer.

EL AUTOR - ESTUDIANTES, manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y la realizó sin violar o usurpar derechos de autor de terceros, por lo tanto la obra es de su exclusiva autoría y tiene la titularidad sobre la misma. PARÁGRAFO: En caso de presentarse cualquier reclamación o acción por parte de un tercero en cuanto a los derechos de autor sobre la obra en cuestión, EL ESTUDIANTE - AUTOR, asumirá toda la responsabilidad, y saldrá en defensa de los derechos aquí autorizados; para todos los efectos la Universidad actúa como un tercero de buena fe.

Para constancia se firma el presente documento en dos (02) ejemplares del mismo valor y tenor, en Bogotá D.C., a los tres 3 días del mes de Julio de Dos Mil Doce 20 12 .

EL AUTOR - ESTUDIANTE.

(Firma) Julian C. Bello R.

Nombre Julian Camilo Bello Rodriguez

C.C. N° 1018439050 de Bogotá D.C

SB-10