



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 161 146**

② Número de solicitud: 009901440

⑤ Int. Cl.⁷: C12P 7/24

C12P 7/40

C12P 7/42

A01N 31/02

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **29.06.1999**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.2001**

Fecha de concesión: **24.05.2002**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.07.2002**

⑮ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.07.2002

⑰ Titular/es: **Consejo Superior de
Investigaciones Científicas
c/ Serrano 117
28006 Madrid, ES
Instituto Karolinska**

⑱ Inventor/es: **Castresana Fernández, Carmen;
Sanz Herrero, Ana y
Hamberg, Mats**

⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Compuestos antimicrobianos, uso y método para inducir resistencia a infecciones de bacterias en plantas.**

㉑ Resumen:

Compuestos antimicrobianos, uso y método para inducir resistencia a infecciones de bacterias en plantas.

La proteína PIOX actúa como α -dioxigenasa, catalizando la incorporación de O₂ molecular sobre diversos ácidos grasos. Se ha procedido a caracterizar la reacción enzimática catalizada por esta proteína y a determinar la estructura de los productos enzimáticos sintetizados a partir de diversos sustratos que forman parte de la presente invención. La caracterización realizada permite proponer que los compuestos generados por la acción de la proteína PIOX participarían en la defensa vegetal actuando como moléculas señalizadoras, involucradas en la activación de genes específicos de importancia para la defensa, o bien ejerciendo un efecto tóxico directo sobre los patógenos.

ES 2 161 146 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Compuestos antimicrobianos, uso y método para inducir resistencia a infecciones de bacterias en plantas.

Sector de la invención

- Biotecnología en agricultura.
- Compuestos antimicrobianos en plantas.

Estado de la técnica

La respuesta de defensa vegetal frente a la infección por microorganismos patógenos se establece mediante la activación transcripcional de genes específicos, cuyos productos de expresión participan, directa o indirectamente, en la protección de la planta dificultando el desarrollo del patógeno en el tejido vegetal.

En estudios anteriores de nuestro grupo (Sanz et al., 1998; "PIOX, a new pathogen-induced oxygenase with homology to animal cyclooxygenase", *The Plant Cell*, 10: 1523-37) se ha comprobado que la proteína PIOX se induce en plantas de tabaco en respuesta a una infección bacteriana, y su aparición, en el tejido infectado, es más rápida cuando la interacción huésped-patógeno que se establece es de tipo incompatible, es decir, cuando la planta se manifiesta resistente a la infección. Este patrón de acumulación proteica es característico de los productos de defensa vegetal, y permite considerar a esta proteína como parte de esta reacción.

Mediante análisis de secuencia y predicción de estructura se ha podido comprobar que la proteína PIOX de tabaco comparte homología con el enzima prostaglandina endoperoxido sintasa (PGHS) de vertebrados, enzima clave en la síntesis de prostaglandinas y de otras moléculas señal de naturaleza lipídica que participan en la regulación de diversos procesos celulares, incluyendo el control de la respuesta inmune y de la inflamación (Sanz et al., 1998; PIOX, a new pathogen-induced oxygenase with homology to animal cyclooxygenase, *The Plant Cell*, 10: 1523-37).

Además de la homología estructural caracterizada, tanto la proteína PIOX de tabaco, como una proteína homóloga identificada en plantas de *Arabidopsis thaliana*, poseen una de las dos actividades enzimáticas asignadas a los enzimas PGHSs, catalizando la oxigenación de ácidos grasos insaturados. Estos resultados ponen de manifiesto la relación funcional que existe entre estos dos tipos de proteínas (Sanz et al., 1998. *The Plant Cell* 10, 1523-1537).

La identificación de una nueva proteína vegetal PIOX, inducible en los tejidos vegetales en respuesta a una infección bacteriana permite suponer su participación, directa o indirecta, en el establecimiento de la interacción planta-patógeno. Por otro lado, el hecho de que la proteína PIOX posea actividad enzimática, catalizando la oxigenación de los ácidos grasos que se liberan de la membrana celular durante el proceso de infección, sugiere la participación de los productos sintetizados en la respuesta de la planta frente a la infección.

Estas dos características ponen de manifiesto el interés de esta proteína y la necesidad de determinar la composición y, posteriormente, la

función de los productos derivados de su actividad.

Descripción de la invención**- Breve descripción de la invención**

La proteína PIOX actúa como α -dioxigenasa, catalizando la incorporación de O_2 molecular sobre diversos ácidos grasos. Se ha procedido a caracterizar la reacción enzimática catalizada por esta proteína y a determinar la estructura de los productos enzimáticos sintetizados a partir de diversos sustratos que forman parte de la presente invención. La caracterización realizada permite proponer que los compuestos generados por la acción de la proteína PIOX participarían en la defensa vegetal actuando como moléculas señalizadoras, involucradas en la activación de genes específicos de importancia para la defensa, o bien ejerciendo un efecto tóxico directo sobre los patógenos.

- Descripción detallada de la invención

La expresión de las proteínas PIOXs, de tabaco y *Arabidopsis*, en células de insecto, ha permitido analizar su actividad enzimática sobre distintos sustratos, y determinar la naturaleza química de los compuestos sintetizados. La incubación de estas enzimas vegetales con ácidos grasos tales como: linolénico (18:3), linoleico (18:2), oleico (18:1), y palmítico (16:0), permite resolver, mediante HPLC, la aparición de tres compuestos distintos, en cada una de las mezclas de incubación examinadas. Los compuestos formados aparecen en distintas proporciones y han sido identificados mediante GLC y espectrofotometría de masas. De acuerdo a la composición de los productos sintetizados (Tabla 1) es posible concluir que los enzimas analizados catalizan un proceso de α -oxidación de ácidos grasos que da lugar a la formación de tres tipos de compuestos: un derivado aldehídico Cn-1, un α -hidroxi-ácido Cn y un ácido graso Cn-1.

TABLA 1

Se detallan los productos sintetizados por los enzimas PIOXs de tabaco y *Arabidopsis* sobre los diversos ácidos grasos utilizados como sustratos. Ambas enzimas catalizan la misma reacción enzimática originando el mismo tipo de compuestos.

Substrato	Productos
Linolénico (18:3)	8(Z), 11(Z), 14(Z)- Heptadecatrienal ácido 2(R)-Hidroxi-9(Z), 12(Z), 15(Z)-octadecatrienoico ácido 8(Z), 11(Z), 14(Z)- heptadecatrienoico
Linoleico (18:2)	8(Z), 11(Z)-Heptadecadienal ácido 2-Hidroxi-9(Z), 12(Z)- octadecadienoico ácido 8(Z), 11(Z)-heptadecadienoico
Oleico (18:1)	8(Z)-Heptadecenal ácido 2-Hidroxi-9(Z)-octadecenoico ácido 8(Z)-heptadecenoico
Palmítico (16:0)	Pentadecanal ácido 2-Hidroxihexadecanoico ácido pentadecanoico

Cuando las incubaciones enzimáticas se reali-

zan a bajas temperaturas, se observa, además, la formación de un cuarto tipo de compuesto, que aparece como el más abundante y que corresponde al α -hidroperóxido derivado del ácido graso utilizado en cada caso. Análisis adicionales han revelado que este compuesto, 2(R)-hidroperóxido 9(Z), 12(Z), 15(Z)-ácido octadecatrienoico en el caso en el que se use ácido linolénico como sustrato, sería el primer producto de la reacción enzimática estudiada y que los tres productos restantes (derivado aldehídico Cn-1, α -hidroxi-ácido Cn y ácido graso Cn-1) se formarían, de forma no enzimática, a partir del α -hidroperóxido correspondiente (Figura 1).

El α -hidroperóxido generado por acción de los enzimas caracterizados puede reducirse, además, por acción de una peroxigenasa que, de forma concomitante, oxidaría una molécula de ácido oleico dando lugar a la formación de un derivado de tipo epóxido (Figura 1).

El sistema de α -oxidación de ácidos grasos ha sido descrito anteriormente en otras especies vegetales. De hecho la utilización de extractos vegetales preparados a partir de frutos de pepino, ha permitido comprobar que la reacción enzimática aquí descrita, corresponde a la que ocurre en estos tejidos vegetales (Andersen et al., 1997. *Biochim. Biophys. Acta* 1344, 47-58). No obstante, a pesar que este sistema de oxidación de ácidos grasos había sido parcialmente caracterizado, la proteína responsable de esta reacción no anteriormente y, por tanto, no se disponía de ninguna información acerca de su secuencia de amino ácidos.

La identificación estructural de los compuestos sintetizados, y su relación con la respuesta vegetal frente a una infección, permite ahora profundizar en el estudio de su posible función durante este proceso. Además, la actividad enzimática descrita podría contribuir también a la formación de otro tipo de compuestos derivados, en este caso, del ácido oleico. Así, se ha comprobado (Figura 1) que el ácido 2(R)-hidroperóxido 9(Z), 12(Z), 15(Z)-octadecatrienoico se reduce a hidróxido en presencia de una peroxigenasa presente en semillas de Vicia faba que, de forma concomitante, cataliza la oxigenación del ácido oleico dando lugar a la formación del compuesto identificado como 9,10-epoxy-octadecenoico (Figura 1).

Todos los compuestos aquí descritos abren nuevas posibilidades de tratamientos de las infecciones en plantas por lo que el uso de los mismos como antimicrobianos o como inductores de protección frente a infecciones bacterianas y forman parte de la presente invención. Por otro lado, el conocimiento de las nuevas posibilidades de estos compuestos permite deducir que plantas transgénicas capaces de expresar la proteína PIOX, y por tanto, producir los compuestos referidos en la presente patente serían resistentes a infecciones bacterianas.

Descripción de las figuras

Figura 1.- Se muestra la reacción enzimática catalizada por las enzimas caracterizadas cuando se emplea el ácido linolénico como sustrato de la reacción. La reacción catalizada se describe como una α -oxidación en la que se incorpora una molécula de O₂ en el carbono α del ácido graso que actúa como sustrato. El primer compuesto

que se sintetiza corresponde a un derivado hidroperóxido que, posteriormente, y de forma no enzimática, origina los tres tipos de compuestos que se muestran en la figura. Por otro lado, el hidroperóxido formado podría ser como sustrato de un segundo enzima (no caracterizado en este trabajo) que catalizaría la reducción del hidroperóxido a hidroxido y, de forma concomitante, la oxidación del ácido oleico a un derivado de tipo epóxido.

Ejemplos

Ejemplo 1

Identificación de productos enzimáticos de PIOX

Los cDNAs correspondientes a las proteínas PIOXs, de tabaco y de Arabidopsis, se clonaron en el vector pFASTBAC (Gibco, BRL), para conseguir su expresión en células de insecto. La expresión de los cDNA *piox* de tabaco y *Arabidopsis* en dichas células permite observar la acumulación de una proteína de ~75 kD, correspondiente al peso molecular esperado en base al tamaño de los cDNAs. A partir de las células conteniendo las proteínas recombinantes, se prepararon extractos proteicos en los que se ensayó la actividad oxigenasa en presencia de diversos ácidos grasos. La determinación del consumo de oxígeno permitió determinar la constantes cinéticas de ambas enzimas frente a los ácidos grasos, linolénico (18:3), linoleico (18:2), oleico (18:1), y palmítico (16:0), utilizados como sustrato. Los extractos proteicos se prepararon utilizando Tris-HCL 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM, glicerol 5%, PMSF 1 mM, pepstatina 10 μ g/ml, quimiostatina 10 μ g/ml, y leupeptina 10 μ g/ml, y las reacciones enzimáticas se realizaron en presencia de fenol 1 mM, 25 μ g de hemoglobina y concentraciones variable de sustrato que oscilaron entre 5 y 320 μ M. La incubación de las muestras se realizó a 23°C y a 30°C sin observarse diferencias significativas en los valores de consumo de oxígeno detectados.

Para proceder a la determinación de los productos enzimáticos derivados de la actividad de las proteínas PIOX, los extractos proteicos, conteniendo las proteínas recombinantes, se incubaron durante 30 min a 23°C con 100 μ M [9, 10, 12, 13, 15, 16-³H₆] ácido linolénico. Los productos extraídos mediante tratamiento con dietil eter se resolvieron, mediante HPLC de fase reversa, utilizando columnas Nucleosil C-18 (250 x 4.6 mm) y empleando acetonitrilo/agua/ácido clorhídrico 2M, como solvente. Este análisis permitió resolver tres picos de radiactividad que se recogieron para determinar su estructura mediante cromatografía de gases y espectrofotometría de masas.

Los tres productos aislados fueron identificados como: 2(R)-hydroxi-9(Z), 11(Z), 13(Z)-ácido-octadecatrienoico ó 2(R)-hydroxi-linolénico, 8(Z), 11(Z), 14(Z)-ácido heptadecatrienoico, y 8(Z), 11(Z), 14(Z)-heptadecatrienal. La composición de dichos productos se confirmó mediante el análisis del espectro de masas correspondiente a los compuestos auténticos obtenidos mediante síntesis química. Los compuestos 8(Z), 11(Z), 14(Z)-ácido heptadecatrienoico, 2(R) y 2(R,S)-hidroxilinolénico se prepararon a partir de semillas de *Thymus vulgaris* tras una extracción en presencia hexano y BHT (2,6-di-

tert - butil - 4 - metil fenol). La obtención de 8(Z), 11(Z), 14(Z) - heptadecatrienal se realizó a partir del 2(R) - hidroxilinolénico sintetizado mediante tratamiento con periodato sódico (1.5 g), acetona (40 mL), ácido acético glacial (20 mL) y agua (10 mL) utilizando una atmósfera de Argon e incubando la mezcla durante 21 h a 50°C.

La incubación de los extractos proteicos que expresan los enzimas recombinantes de tabaco y *Arabidopsis* con los restantes substratos (linoleico, oleico, y palmítico) permitió examinar la estructura de los compuestos sintetizados en cada caso. Utilizando cromatografía de gases y espectrofotometría de masas, se determinó la formación del mismo tipo de productos a partir de los distintos substratos, es decir, la formación de un derivado aldehídico Cn-1, un α -hidroxi-ácido Cn y un ácido graso Cn-1.

Cuando la incubación de los extractos proteicos se realiza a 0°C durante 20 min en presencia de 100 μ M [9, 10, 12, 13, 15, 16-³H₆] ácido linolénico, se detecta (utilizando los mismos métodos descritos anteriormente) la formación de un nuevo compuesto identificado como 2(R) - hidroperoxido 9(Z), 12(Z), 15(Z) - ácido octadecatrienoico. Este compuesto es inestable y se convierte espontáneamente a 2(R) - hidroxilinolénico (mediante reducción) y a 8(Z), 11(Z), 14(Z)-heptadecatrienal (mediante decarboxilación térmica), sugiriendo que el primer pro-

ducto derivado de la reacción enzimática catalizada por los enzimas vegetales corresponde a 2(R) - hidroperoxido 9(Z), 12(Z), 15(Z) - ácido octadecatrienoico, y que los productos restantes se producen de forma no enzimática a partir del hidroperoxido inicial.

La progresión de la reacción en este sentido se examinó tras realizar la incubación enzimática en una atmósfera de ¹⁸O₂, comprobándose que una proporción elevada de los compuestos generados a partir del ácido linolénico contenían 2 átomos de ¹⁸O, sintetizándose por tanto mediante incorporación de una molécula de O₂ molecular, como correspondería a la formación de un compuesto de tipo hidroperoxido. Por otro lado, la degradación no enzimática del ácido 2(R) - hidroperoxido - linolénico se comprobó tras mantener el compuesto purificado en tampón fosfato pH 7.4 durante 30 min a 23°C, y determinar la aparición de los productos 8(Z), 11(Z), 14(Z) - heptadecatrienal y 8(Z), 11(Z), 14(Z) - ácido heptadecatrienoico. Igualmente, la incubación del ácido 2(R) - hidroperoxido - linolénico con los extractos proteicos preparados a partir de células de insecto control, no transformadas, permite detectar la formación de los productos mencionados y, además, del hidroxido correspondiente, 2(R) - hydroxi - 9(Z), 11(Z), 13(Z) - ácido - octadecatrienoico ó 2(R) - hydroxi - linolénico.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Compuestos antimicrobianos **caracterizados** porque se obtienen por reacción enzimática de la proteína PIOx, que actúa como catalizador como α -dioxigenasa, con ácidos grasos, tales como linolénico, linoleico, oleico y palmítico.

2. Compuestos obtenidos según reivindicación 1 por reacción enzimática de la proteína PIOx, de tabaco y *Arabidopsis*, con linolénico como sustrato (18:3):

8(Z), 11(Z), 14(Z)-Heptadecatrienal

ácido 2(R) - Hidroxi - 9(Z), 12(2),15(Z) - octadecatrienoico

ácido 8(Z), 11(Z), 14(Z)-heptadecatrienoico

3. Compuestos obtenidos según reivindicación 1 por reacción enzimática de la proteína PIOx, de tabaco y *Arabidopsis*, con linoleico como sustrato (18:2):

8(Z), 11(Z)-Heptadecadienal

ácido 2 - Hidroxi - 9(Z), 12(Z) - octadecadienoico

ácido 8(Z), 11(Z)-heptadecadienoico

4. Compuestos obtenidos según reivindicación 1 por reacción enzimática de la proteína PIOx, de tabaco y *Arabidopsis*, con Oleico como sustrato (18:1):

8(Z)-Heptadecenal

ácido 2-Hidroxi-9(Z)-octadecenoico

ácido 8(Z)-heptadecenoico

5. Compuestos obtenidos según reivindicación 1 por reacción enzimática de la proteína PIOx, de tabaco y *Arabidopsis*, con Palmítico como sustrato (16:0):

Pentadecanal

ácido 2-Hidroxihexadecanoico

ácido pentadecanoico

6. Uso de los compuestos según reivindicaciones anteriores en el tratamiento de infecciones bacterianas en plantas.

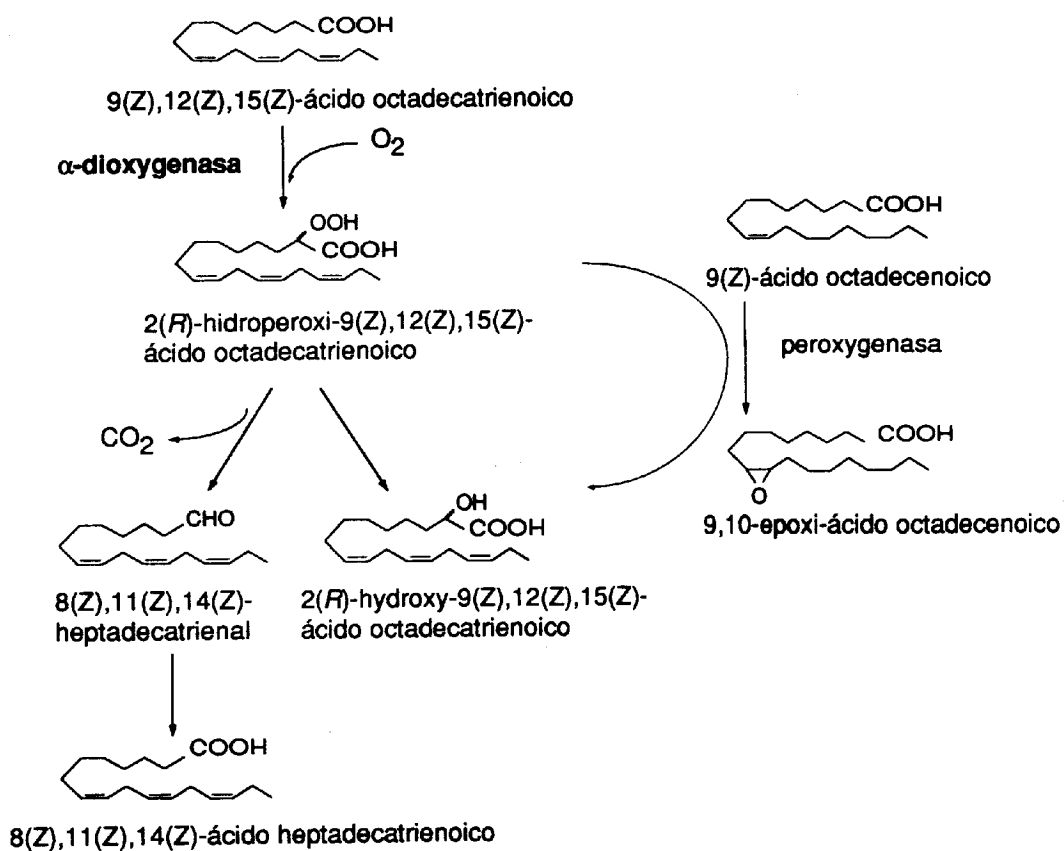


Figura 1



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: C12P 7/24, 7/40, 7/42, A01N 31/02

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SANZ, A. y col. PIOX, a New Pathogen-Induced Oxygenase with Homology to Animal Cyclooxygenase. The Plant Cell. Septiembre 1998, Vol. 10, páginas 1523-1537. Resumen; discusión.	1-6
A	FARMER, E.E. & RYAN, C.A. Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Octubre 1990, Vol. 87, páginas 7713-7716. Resumen.	1
A	GALLIARD, T. & MATTHEW, J.A. THE ENZYMIC FORMATION OF LONG CHAIN ALDEHYDES AND ALCOHOLS BY ALPHA-OXIDATION OF FATTY ACIDS IN EXTRACTS OF CUCUMBER FRUIT (CUCUMIS SATIVUS). Biochimia et Biophysica Acta. 1976, Vol. 424, páginas 26-35. Resumen.	1-5
A	AKIKAZU HATANAKA. THE BIOGENERATION OF GREEN ODOUR BY GREEN LEAVES. Phytochemistry. 1993, Vol. 34, N° 5, páginas 1201-1218.	1-5

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe

26.10.2001

Examinador

E. Albarrán Gómez

Página

1/1