



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 190 870**

(21) Número de solicitud: 200100844

(51) Int. Cl.⁷: **C12N 9/16**

C12N 15/55

C12N 1/21

A01H 5/00

(12)

PATENTE DE INVENCIÓN

B1

(22) Fecha de presentación: **10.04.2001**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.2003**

Fecha de la concesión: **05.05.2004**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **01.06.2004**

(45) Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.06.2004

(73) Titular/es: **Universidad Pública de Navarra
Campus Arrosadia s/n OTRI Edf. El Sario
31006 Pamplona, Navarra, ES**

(72) Inventor/es: **Pozueta Romero, Javier;
Baroja Fernández , Edurne;
Muñoz Pérez, Francisco José;
Moreno Bruna, Beatriz;
Zandueta Criado, Aitor;
Rodríguez López, Milagros y
Bastarrica Berasategui, Ainara**

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto de**

(54) Título: **ADPglucosa pirofosfatasa bacteriana, procedimiento de obtención, uso en la fabricación de dispositivos de ensayo y en la obtención de plantas transgénicas.**

(57) Resumen:

ADPglucosa pirofosfatasa bacteriana, procedimiento de obtención, uso en la fabricación de dispositivos de ensayo y en la obtención de plantas transgénicas.

La AGPPasa es un enzima que cataliza la hidrólisis de ADPG (Adenosina difosfato glucosa). El enzima obtenido a partir de extractos microbianos se utiliza en dispositivos de ensayo para determinar niveles de ADPG, basados en la G1P (glucosa-1-fosfato) liberada por la reacción catalizada por la AGPPasa. Asimismo se describen secuencias parciales de aminoácidos del enzima, la secuencia del gen que la codifica y la proteína deducida. Por último se describe la obtención de plantas transgénicas que sobre-expresan el gen de la AGPPasa y que poseen un contenido alto en azúcares solubles, bajo contenido en almidón y una alta resistencia a altas concentraciones de sales y temperaturas.

ES 2 190 870 B1

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

DESCRIPCION

ADPglucosa pirofosfatasa bacteriana, procedimiento de obtención, uso en la fabricación de dispositivos de ensayo y en la obtención de plantas transgénicas.

5 Sector de la técnica al que se refiere la invención

La invención se refiere al sector de la obtención, purificación y caracterización del enzima ADPglucosa pirofosfatasa (AGPPasa), su utilización para la elaboración de dispositivos (kits) de determinación de ADPG en extractos tanto vegetales como microbianos o de otra procedencia, y a la obtención de plantas transgénicas en las que se sobreexpresa el gen que codifica para la AGPPasa, *aspP*, dando lugar a plantas con reducido contenido en almidón, alto contenido de azúcares solubles y alta resistencia a sanidad y altas temperaturas.

Estado de la técnica anterior

Tanto el glucógeno como el almidón constituyen formas de almacenamiento de carbohidratos en bacterias y plantas, respectivamente. En plantas el almidón se acumula en gran des cantidades en órganos tales como semillas (trigo, cebada, maíz, guisante, etc.) y tubérculos (patata y batata entre otros), y es un constituyente fundamental de la dieta del ser humano. Por otro lado, el almidón es utilizado frecuentemente en las industrias papelera, cosmética, farmacéutica y alimentaria, y también se utiliza como componente fundamental para la fabricación de plásticos biodegradables y pinturas de bajo impacto medioambiental. Constituidos por moléculas de glucosa unidas covalentemente, el estudio de los procesos implicados en la síntesis de estos polisacáridos constituye un tema prioritario en diversos ámbitos de la producción industrial.

El ADPglucosa (ADPG) es el precursor universal de la biosíntesis del almidón en plantas y del glucógeno bacteriano. Las reflexiones acerca de los factores que gobiernan los niveles intracelulares de ADPG han girado fundamentalmente en torno a la regulación del enzima sintetizador, el ADPG pirofosforilasa (Preiss, (1988) "Biosynthesis of starch and its regulation" The Biochemistry of Plants. Vol. 14, Academic Press, New York, pp.182-249; Pozueta-Romero, J., Perata, P., Akazawa, T. (1999) "Sucrose-starch conversion in heterotrophic tissues". Crit. Rev. Plant. Sci. 18, 489-525 ; Preiss, J.(1984) Bacterial glycogen synthesis and its regulation, Ann. Rev. Microbiol. 38, 419-458 ; Preiss, J., Romeo, T. (1994) Molecular biology and regulatory aspects of glycogen biosynthesis in bacteria, Prog. Nucleic. Acid Res. Mol Biol. 47, 301-327). Sin embargo, poco se ha investigado sobre posibles mecanismos de degradación del ADPG que contribuyan a modular los niveles almidón y glucógeno acumulados por la célula (Feingold, D.S., Avigad, G. (1980). "Sugar transformation in plants". The Biochemistry of Plants. Vol. 3, Stumpf, P.K. and Conn, E.E. eds. Academic Press, New York, pp. 101-170) y pocos son los indicios de que tanto bacterias como plantas dispongan de una maquinaria enzimática capaz de hidrolizar ADPG (Melo, A., Glaser, L. (1966) "Nucleotide diphosphate hexosepyrophosphatases". Biochem. Biophys. Res. Commun. 22, 524-531; Rodríguez-López, M., Baroja-Fernández, E., Zandueta-Criado, A., Pozueta-Romero,J.(2000) "Adenosinediphosphate glucose pyrophosphatase: a plastidial phosphodiesterase that prevents starch biosynthesis". Proc. Natl. Acad. Sci., 97, 8705-8710; Baroja-Fernández, E., Zandueta-Criado, A., Rodríguez-López, M., Akazawa, T., Pozueta-Romero, J. (2000) "Distinct isoforms of ADPglucose pyrophosphatase and ADPglucose pyrophosphorylase occur in the suspensioncultured cells of sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.)". FEBS Lett. 480, 277-282; Rodríguez-López, M., Baroja-Fernández, E., Zandueta-Criado, A., Moreno-Bruna, B., Muñoz, F.J., Akazawa, T., Pozueta-Romero, J. (2001) "Two isoforms of a nucleotide-sugar pyrophosphatase/phosphodiesterase from barley leaves (*Hordeum vulgare* L.) are distinct oligomers of HvGLP1, a germin-like protein". FEBS Lett. 490, 44-48).

Las diferentes aplicaciones del almidón producido en una planta están basadas principalmente en el balance de amilosa y amilopectina, el cual determina la estructura del gránulo de almidón, así como su viscosidad en suspensiones acuosas. Tal proporción de amilosa y amilopectina depende de la concentración de ADPG en la célula vegetal (Clarke, B.R., Denyer, K., Jenner, C.F., Smith, A.M. (1999) "The relationship between the rate of starch synthesis, the adenosine 5'-diphosphoglucose concentration and the amylose content of starch in developing pea embryos". Planta 209, 324-329).

Además de actuar como sustancia de reserva para la planta, el almidón se acumula en la célula vegetal en circunstancias en las que la planta no está sometida a condiciones de stress hídrico. En condiciones en las que la planta se ve sometida a altas temperaturas o altas concentraciones de sales en el medio, la planta deja de acumular almidón, produciendo grandes cantidades de azúcares solubles que se acumulan en la vacuola (Keeling, P.L., Bacon, P.J., Holt, D.C (1993) "Elevated temperature reduces starch deposition in wheat endosperm by reducing the activity of soluble starch synthase" Planta 191, 342-348;

ES 2 190 870 B1

Geigenberger, P., Geiger, M., Stitt, M.(1998) "High-temperature perturbation of starch synthesis is attributable to inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase by decreased levels of glycerate-3-phosphate in growing potato tubers" Plant Physiol. 117, 1307-1316).

5 La invención describe la purificación y aplicaciones de un producto enzimático de origen microbiano que denominamos AGPPasa que cataliza la hidrólisis de ADPG. En la presente invención se consiguió secuenciar parcialmente la AGPPasa de *Escherichia coli*. Tras comparar los fragmentos secuenciados con las secuencias disponibles en los bancos de datos, se concluye que AGPPasa es una proteína perteneciente al grupo de las "nudix hydrolases" codificada por la secuencia del genoma de *E. coli* denominada *orf209* cuyo producto no había sido identificado hasta el momento en la célula y al cual se le atribuía la posible función de regular el contenido de ADPribose en la célula (Bessman, M.J., Frick, D.N., O'Handley, S.F.(1996) "The MutT Proteins or "Nudix" hydrolases, a family of versatile, Widely distributed "housecleaning" enzymes" J. Biol. Chem. 271, 25059-25062; Dunn, C.A., O'Handley, S.F., Frick, D.N., Bessman, M.J. (1999) "Studies on the ADP-ribose pyrophosphatase subfamily of the Nudix hydrolases and tentative identification of *trgB*, a gene associated with tellurite resistance" J. Biol. Chem. 274, 32318-32334). El número de acceso de *aspP* (el gen que codifica para AGPPasa y que previamente se designó con el nombre de *orf209*) disponible en el banco de datos de la EMBL es: AJ298136.

20 Las técnicas cromatográficas constituyen una poderosa herramienta de determinación de contenido de ADPG en extractos vegetales y microbianos (Sweetlove, L.J., Burrell, M.M., ap Rees, T. (1996) "Starch metabolism in tubers of transgenic potato (*Solanum tuberosum*) with increased ADPglucose pyrophosphorylase" Biochem. J. 320, 493-498; Shannon, J.C., Pien, F-M., Liu, K-C. (1996) "Nucleotides and nucleotide sugars in developing maize endosperms" Plant Physiol. 110, 835-843; Geigengerger, P., Reimboltz, R., Geiger, M., Merlo, L., Canale, V. Stitt, M. (1997) "Regulation of sucrose and Starch 25 metabolism in potato tubers in response to short-term water deficit" Planta 201, 502-518; Geigenberger, P., Geiger, M., Stitt, M.(1998) "High-temperature perturbation of Starch synthesis is attributable to inhibition of ADPglucose pyrophosphorylase by decreased levels of glycerate-3-phosphate in growing potato tubers" Plant Physiol. 117, 1307-1316). Aunque de uso muy generalizado, requieren una inversión importante en equipamientos. Lamentablemente, se hace escaso uso de posibles métodos alternativos 30 que permitan la detección y cuantificación de ADPG de una manera simple y eficaz. Evidentemente, la posibilidad de analizar de manera simple y poco costosa los niveles de ADPG en una muestra constituye una alternativa ventajosa respecto a las técnicas cromatográficas.

35 Un objeto de la invención es, en primer lugar, la obtención de AGPPasa en forma sustancialmente pura, a partir de *E. coli*, su caracterización y la identificación del gen que la codifica. Otro objeto de la invención es el procedimiento seguido para la elaboración de dispositivos o kits de determinación de ADPG basados en el empleo del producto enzimático con actividad AGPPasa. Identificado el gen que codifica para la AGPPasa, *aspP*, se detalla el diseño de construcciones derivadas del mismo destinadas a la obtención de plantas transgénicas con alta actividad AGPPasa cuyo contenido y calidad del almidón 40 estén modificados respecto a las plantas control.

Descripción detallada de la invención

*Obtención y purificación de AGPPasa a partir de *E. coli**

45 AGPPasa existe en diferentes estirpes de *E. coli* (BL21, ATCC12793 y K12 entre otras), *Salmonella typhimurium* y *Haemophilus influenzae*. El método general de obtención y purificación de la AGPPasa descrito en la invención se ilustra utilizando *E. coli* BL21 e incluye los siguientes pasos, en los que pueden admitirse pequeñas variaciones que no modifiquen sustancialmente el esquema general del procedimiento 50 de extracción y purificación:

1. Centrifugación a 10.000 g de 30 litros de una suspensión bacteriana crecida hasta estado estacionario en medio mínimo M9 (96 mM Na₂HPO₄, 44 mM KH₂PO₄, 15 mM NaCl, 35 mM NH₄Cl, 0.1 mM CaCl₂, 2 mM MgSO₄) con 5 mM de glucosa
2. Las bacterias se resuspenden en 200 ml de 50 mM Tris-HCl pH 7.5 y, tras ser sonicadas se ultracentrifugaron a 100.000 g durante 30 minutos.
3. El sobrenadante se calienta a 58°C durante 10 minutos y se centrifuga a 30.000 g durante 30 minutos.
4. Las proteínas del sobrenadante se precipitan en 30 %-50 % de sulfato de amonio y se resuspenden en 2.7 ml de 50 mM Tris-HCl pH 7.5.

ES 2 190 870 B1

5. La muestra se aplica a una columna de filtración en gel de tipo Superdex 200 (Pharmacia LKB), preequilibrada con 50 mM Tris-HCl pH 7.5/150 mM NaCl.
6. Las fracciones que muestran actividad AGPPasa se concentran, dializadas y aplican a una columna Mono-Q (HR 5x5, Pharmacia) equilibrada con 50 mM Tris-HCl pH 7.5. El enzima se eluye con un gradiente de 45 ml de 0-1 M KCl en 30 mM Tris-HCl pH 8.0.
7. Las fracciones activas se someten a un paso de isoelectroenfoque haciendo uso de un Rotofor Cell (BioRad).

10 *Identificación del producto con actividad enzimática AGPPasa*

El producto enzimático obtenido por los procedimientos arriba descritos, u otros equivalentes, se identifica mediante los siguientes patrones funcionales:

- 15 ■ Es una “adenosina difosfato-azúcar pirofosfatasa” (EC 3.6.1.21) que cataliza la hidrólisis del ADPG en cantidades equimolares de GIP y AMP
- 20 ■ Además del ADPG, reconoce ADPmanosa y ADPribosa, pero no reconoce otros azúcares-nucleótidos tales como UDPglucosa, GDPmanosa, UDPglucorónico, etc. Tampoco reconoce nucleótidos tales como adenosina 5'-fosfo-sulfato, ATP, AD P, UTP, GTP ni el sustrato artificial bis-paranitrofenil-fosfato utilizado para la caracterización de fosfodiesterasas.
- 25 ■ No hidroliza moléculas con enlaces fosfomonooéster tales como la G1P, G6P, AMP, 3-fosfoglicerato, y otras similares. Tampoco hidroliza AMP cíclico ni ácidos nucleicos de larga cadena tales como ADN o ARN.
- 30 ■ Se inhibe por moléculas fosforiladas tales como el AMP, ADP, ATP, 3-fosfoglicerato, pirofosfato inorgánico, y otras de características semejantes.
- 35 ■ Se inhibe fuertemente por molibdato.
- Su actividad se ve afectada por la acción del β -mercaptoetanol, EDTA, cisteína reducida, ascorbato, y otros agentes reductores y quelantes.
- Muestra máxima actividad en un rango de pH comprendido entre 7.5 y 8.5.

35 *Ampliación del gen (aspP) de E. coli que codifica para la AGPPasa*

Conocida la secuencia aminoacídica de la AGPPasa se contrastó con otras existentes en los bancos de datos. Ello permitió identificar el gen que codifica para la AGPPasa al cual se le ha asignado el nombre 40 de *aspP*. El conocimiento de la secuencia nucleotídica de *aspP* permitió la creación de dos cebadores específicos. Haciendo uso de estos cebadores se amplificó por métodos convencionales de PCR un DNA de 640 pares de bases a partir del ADN genómico de *E. coli* BL21, que se introdujo entre los sitios de restricción *EcoRV/SmaI* del plásmido pSK Bluescript (Stratagene) dando lugar a la construcción pASPP (Fig. 1) la cual fue amplificada en la bacteria hospedadora XL1 Blue.

45 *Obtención de AGPPasa a partir de E. coli que sobreexpresó aspP*

pASPP fue digerido con los enzimas de restricción *HindIII* y *NotI*. El fragmento liberado (que contiene a *aspP*) fue clonado en el vector de expresión pET-28a(+) (Novagen), dando lugar al plásmido pET-50 ASPP (Fig. 1) el cual fue introducido por electroporación en *E. coli* BL21(DE3). La cepa de *E. coli* fue depositada en la Colección Española de Cultivos tipo el 5.10.2000, sita en el Edificio de Investigación de la Universidad de Valencia, Campus de Burjassot, Burjassot 46100 (Valencia, España) con el n° de depósito CECT5357. La sobre-expresión de *aspP* tuvo lugar mediante la adición de 1 mM isopropil- β -D-tiogalactopiranósido (IPTG) en 100 ml de cultivo celular. Tras seis horas de cultivo inducido se 55 recogieron las bacterias y se resuspendieron en 4 ml de “binding buffer” (Novagen, Hisbind purification kits), se sonicaron y se centrifugaron a 40.000 g durante veinte minutos. El sobrenadante que contiene la AGPPasa con una cola de histidinas se hizo pasar a través por una columna de afinidad del kit de purificación de proteínas “His-bind” de Novagen. Siguiendo las instrucciones del kit se eluyó AGPPasa con 6 ml del tampón de elución recomendado.

Obtención de plantas transgénicas que sobreexpresan aspP

pASPP fue digerido con los enzimas *NcoI* y *XbaI*. El fragmento liberado (que contiene a *aspP*) fue clonado en el plásmido pVT'BSB en los sitios *NcoI/XbaI*. De este modo se obtiene un plásmido denominado pVT'ASPP el cual posee el promotor constitutivo 35S, *aspP* y el terminador Nos.

Para poder transferir esta construcción al genoma de las plantas vía *Agrobacterium tumefaciens*, es preciso que previamente sea clonada en un plásmido binario. Para ello, pVT'ASPP fue digerido secuencialmente con los enzimas *EcoRI*, T4 DNA polimerasa y *HindIII* y se clonó dentro del plásmido binario pCGN1548 (McBride, K.E., Summerfelt, K.R. (1990) "Improved binary vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation". Plant Mol. Biol. 14, 269-276) que previamente había sido digerido secuencialmente con los enzimas *XbaI*, T4 DNA polimerasa y *HindIII*. El plásmido así obtenido se designó con el nombre de pCGN154835SASPP (Fig. 2). Tras amplificarse en *E. coli* (XL1 Blue), pCGN154835SASPP se introdujo en *Agrobacterium tumefaciens* (CECT 5901) el cual fue utilizado para transformar especies tales como tomate, tabaco, patata, etc. (Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G., Fraley, R.T. (1985) "A simple and general method for transferring genes into plants" Science 277, 1229-1231. La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* fue depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo el 16.02.2001, sita en el Edificio de Investigación de la Universidad de Valencia, Campus de Burjasot, Burjasot 46100 (Valencia, España), con el nº de depósito CECT 5901.

Elaboración de un dispositivo (kit) de ensayo para determinación de ADPG en extractos de origen vegetal o bacteriano

El kit diseñado para la determinación e ADPG está basado en la acción del producto con actividad AGPPasa sobre la molécula ADPG, liberando cantidades equimolares de AMP y glucosa-1-fosfato (G1P) de fácil detección por técnicas espectrofotométricas. La G1P se somete a la acción del enzima fosfoglucomutasa, rindiendo glucosa-6-fosfato (G6P), que a su vez puede hacerse reaccionar acopladamente con NAD⁺ por acción del enzima G6P deshidrogenasa, obteniéndose 6-fosfogluconato y NADH, fácilmente determinable por espectrofotometría a 340 nm.

Ejemplos de realización de la invención

Se describen a continuación ejemplos en los que se muestra detalladamente el procedimiento de obtención y purificación de la AGPPasa. Otros ejemplos muestran la utilización de la AGPPasa para la producción de kits (dispositivos de ensayo) de determinación de ADPG en tejidos vegetales. Otro ejemplo muestra la obtención de *aspP*. Por último otro ejemplo muestra la obtención de plantas transgénicas que sobreexpresan *aspP*.

Ejemplo 1

Extracción y purificación de la AGPPasa

Todos los pasos se desarrollaron a 4°C, a no ser que se indique otra cosa. Treinta litros de cultivo de *E. coli* BL21 se centrifugaron a 10.000 g y el pellet bacteriano se resuspendió en 200 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 7.5. Tras ser sonicado, el extracto crudo bacteriano se centrifugó a 100.000 g durante 30 minutos y el sobrenadante se calentó a 58°C durante diez minutos. Tras centrifugar a 30.000 g, la AGPPasa existente en el sobrenadante se precipitó con 30 %-50 % de sulfato amónico. El precipitado obtenido tras 30 minutos de centrifugación a 30.000 g (20°C) fue resuspendido en 2.7 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 7.5. La muestra se sometió a continuación a filtración en gel en columna Superdex 200 (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia) preequilibrada con Tris-HCl 50 mM pH 7.5 y NaCl 150 mM. La elución se efectuó con el mismo tampón. Las fracciones con actividad AGPPasa se juntaron, se concentraron y se aplicaron a una columna de intercambio iónico de tipo mono-Q (XR 5x5, Pharmacia). Tras ser eluidas en un gradiente con KCl, las fracciones activas se juntaron, se dializaron, se concentraron y se aplicaron a isoelectroenfoque utilizando un Rotofor Cell (Bio-Rad). Las fracciones activas tenían un pI aproximado de 5.2, las cuales fueron juntadas, concentradas y utilizadas para separación electroforética en SDS-PAGE.

Ejemplo 2

Ensayos enzimáticos

A no ser que se indique otra cosa, todas las reacciones enzimáticas se desarrollaron a 37°C. Las

ES 2 190 870 B1

determinaciones de actividades AGPPasa se realizaron utilizando la determinación espectrofotométrica de G1P en dos pasos descrita por Sowokinos (1981) (Sowokinos, 1981, *Plant Physiol.* 68, 924-929). La mezcla de reacción contenía Tris-HCl 50 mM pH 7.5, 5 MM MgCl₂, la cantidad especificada de ADPG y el extracto proteico en un volumen total de 50 microlitros. Todos los ensayos se realizaron frente a blanco de ADPG. Tras 20 minutos de incubación, la reacción se detenía mediante ebullición en baño seco durante 2 minutos. La mezcla se centrifugaba a 20.000 g durante 5 minutos y se recuperaba el sobrenadante. En el segundo paso, se determinaba G1P espectrofotométricamente en 300 microlitros de mezcla conteniendo Hepes 50 mM pH 7, EDTA 1 MM, MgCl₂ 2 mM, KCl 15 mM, NAD⁺ 0,6 mM, una unidad de fosfoglucomutasa y otra de G6P deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides*, y 30 microlitros del sobrenadante resultante del paso uno. Tras 20 minutos de incubación, la producción de NADH se monitorizó a 340 nm utilizando un espectrofotómetro Multiskan EX (Labsystems). Fue despreciable la cantidad de NADH producida por cualquier extracto proteico en ausencia de ADPG en el paso uno.

La masa molecular nativa de la AGPPasa se determinó mediante filtración en gel por medio de una representación del coeficiente de partición (Kav) frente al logaritmo de la masa molecular de las siguientes proteínas patrones: tiroglobulina bovina (670 kDa), gamma-globulina bovina (158 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), mioglobina (17 kDa) y vitamina B-12 (1,3 kDa). El contenido en proteína se determinó por el método de Bradford utilizando el reactivo preparado por Bio-Rad y gamma-globulina como patrón.

La tabla 1 presentada a continuación refleja la purificación de la AGPPasa bacteriana. La unidad (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la producción de 1 μmol de producto por minuto.

TABLA 1

| | Volumen total (mL) | Proteína total (mg) | Actividad total (mU) | Actividad específica (mU/mg proteína) | Purificación (factor) | Rendimiento % |
|-------------------------------|--------------------|---------------------|----------------------|---------------------------------------|-----------------------|---------------|
| Extracto crudo | 198 | 4.206 | 12.905 | 3 | - | 100 |
| Sobrenadante 100000 x g, 58°C | 166 | 462 | 54.499 | 118 | 38 | 422 |
| Sulfato amónico 50 % | 2,7 | 101 | 29.719 | 293 | 95 | 155 |
| Superdex 200 | 15 | 7,4 | 19.125 | 2.584 | 842 | 148 |
| Mono-Q | 2,7 | 1,9 | 6.023 | 3.170 | 1.032 | 47 |
| Isoelectro enfoque | 0,6 | 0,2 | 1.807 | 9.511 | 3.098 | 15 |

Ejemplo 3

Identificación del producto con actividad enzimática obtenido

El producto con actividad AGPPasa así obtenido cumple las siguientes características:

- La AGPPasa bacteriana es una pirofosfatasa que cataliza la hidrólisis del ADPG produciendo cantidades equimolares de G1P y AMP.
- Además del ADPG, también hidroliza ADPribosa y ADPmanosa.
- No hidroliza moléculas con enlaces fosfomonooéster tales como la G1P, G6P, AMP, 3-fosfoglicerato, y otras similares. Tampoco hidroliza AMP cíclico ni ácidos nucleicos de larga cadena tales como ADN y ARN.
- Requiere magnesio para su funcionamiento óptimo.
- No hidrolizabis-para-nitrofenil-fosfato, que es una sustancia hidrolizable por fosfodiesterasas.

ES 2 190 870 B1

- Se inhibe por moléculas fosforiladas tales como el AMP, ADP, ATP, 3-fosfoglicerato, pirofosfato inorgánico, y otras de características semejantes, pero no por ortofosfato.
 - Se inhibe fuertemente por molibdato.
- 5 ■ Su actividad se ve negativamente afectada por la acción del (β -mercaptoetanol, EDTA, cisteína reducida, glutathion reducido, glutamato, aspartato, ascorbato, y otros agentes reductores y quelantes.
- Constante de Michaelis-Menten (K_m) para ADPG, de 0,15 mMolar.
- 10 ■ Peso molecular aparente de la proteína purificada en: geles desnaturizantes, en torno a 26 kDa.
- Peso molecular aparente medido por filtración en gel, en torno a 40-50 kDa, indicando que posiblemente se trate de, un homodímero.
- 15 ■ En la presente invención, la caracterización de la secuencia de aminoácidos nos permite conocer otra serie de características, como son:
- La secuencia aminoacídica obtenida mediante la degradación de Edman es:
 - Extremo N-terminal: SEQ ID NO: 1
- 20

Ejemplo 4

Obtención del cien que codifica para la AGPPasa

25 El conocimiento de la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la AGPPasa de *E. coli*, *aspP*, permitió la creación de dos cebadores específicos cuyas secuencias son, en sentido 5' - 3', SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3. Haciendo uso de estos cebadores se amplificó por métodos convencionales de PCR un fragmento de DNA a partir del DNA cromosómico de *E. coli* BL21, que se introdujo en un plásmido pSK Bluescript (Stratagene) el cual fue amplificado en la bacteria hospedadora XL1 Blue. La secuencia nucleotídica del DNA es SEQ ID NO: 4 y la secuencia aminoacídica deducida es SEQ ID NO: 5.

Ejemplo 5

*Obtención de AGPPasa a partir de *E. coli* BL21(DE3) que sobreexpresa *aspP**

35 La inducción de *aspP* en bacterias BL21(DE3) transformadas con pET-ASPP tuvo lugar al añadir 1 mM IPTG. Tras seis horas adicionales de cultivo, se observó que las bacterias transformadas con pET-ASPP tenían una actividad AGPPasa significativamente más alta que las control transformadas con el plásmido pET-28a(+) (ver Fig. 3). Las bacterias transformadas con pET-ASPP se recogieron, se resuspendieron en el tampón especificado por el kit "Hisbind" (Novagen) de purificación de proteínas, y se lisaron mediante sonicación. El sobrenadante obtenido tras centrifugación del lisado se hizo pasar por una columna de afinidad del kit de purificación de proteínas "His-bind" de Novagen. La proteína obtenida tenía un tamaño de 30 kDa en geles desnaturizantes, que es ligeramente superior a los 26 kDa de la proteína que produce la propia bacteria debido a la unión de una cola de histidinas. La proteína purificada tenía propiedades cinéticas y de especificidad de sustrato idénticas a las descritas para la AGPPasa producida por bacterias no transformadas. Por otro lado, los niveles de glucógeno de las bacterias transformadas con pET-ASPP eran prácticamente indetectables y significativamente inferiores a las bacterias control (Fig. 4).

Ejemplo 6

Obtención de plantas transgénicas de tabaco, patata y tomate que sobreexpresan AGPPasa

50 Utilizando la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* CECT 5837 se obtuvieron plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), patata (*Solanum tuberosum*) y tomate (*Lycopersicon esculentum*) con alta actividad AGPPasa en todos los órganos analizados (raíz, hoja, frutos, tubérculos y tallo). Tales plantas presentaron las siguientes características:

- 55 1. Bajo contenido en almidón (según las técnicas de medición basadas en kits comerciales descritas en la literatura (Frehner, M., Pozueta-Romero, J., Akazawa, T. (1990) "Enzyme sets of glycolysis, gluconeogenesis, and oxidative pentose phosphate pathway are not complete in nongreen highly purified amyloplasts of sycamore cell suspension cultures" Plant Physiol. 94, 538-544)).

ES 2 190 870 B1

2. Alto contenido en azúcares solubles tales como sacarosa, glucosa-6-fosfato, glucosa y fructosa y bajo contenido en ADPG, ADPmanosa y ADPríbosa.
 3. La morfología externa de la planta no era aberrante, tras ser comparada con la de las plantas no transformadas.
 4. Las plantas mostraban gran resistencia a altas temperaturas y a altas concentraciones de sales en el medio de cultivo.

10 Ejemplo 7

Elaboración de kits enzimáticos de determinación de ADPG

Para la determinación de ADPG se elabora un kit que contiene los siguientes elementos:

- 15 a. AGPPasa obtenida desde bacterias BL21(DE3) transformadas con pET-ASPP, y purificada haciendo uso del kit "His-Bind" (Novagen).

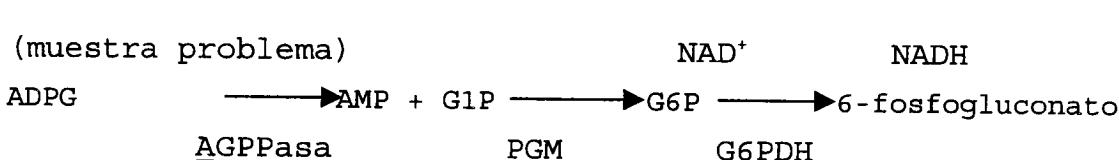
b. NAD

20 c. Fosfoglucomutasa (PGM)

d. G6P deshidrogenasa (G6PDH)

e. Tampón

La determinación de la cantidad de ADPG presente en la muestra problema se basa en la determinación espectrofotométrica del NADH producido según la siguiente reacción acoplada:



La determinación de la cantidad de ADPG en una muestra problema tendría lugar mediante la elaboración de un cocktail cuya composición sería (para 1 ml):

- Muestra problema
 - 1 U de AGPPasa
 - 1 U de PGM
 - 1 U de G6PDH
 - 0.6 mM NAD
 - Tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl₂ 5 mM
 - Agua (hasta completar 1 ml)

Se incuba a 37°C durante 20 minutos y se observa la variación de absorbancia de la muestra a 340 nm. Como control negativo se puede utilizar un cocktail en el que falte la AGPPasa.

⁵⁵ Descripción de las figuras

Figura 1: Etapas construcción del plásmido pET-ASPP

Figura 2: Etapas construcción del plásmido pCGN154835SAPP

Figura 3: Actividad AGPPasa

Eje de abcisas: tiempo de incubación en horas

ES 2 190 870 B1

Eje de ordenadas: miliunidades/ml de cultivo celular.

Figura 4: Niveles de glucógeno en las bacterias control (pET-28a(+)) frente a las transformadas pET-ASPP Eje de abcisas: tiempo de incubación en horas Eje de ordenadas: μg de glucógeno/ml cultivo celular.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de un producto enzimático de origen microbiano que posee actividad ADPG pirofosfatasa **caracterizado** porque comprende (1) cultivar un microorganismo en un medio nutritivo con fuentes de carbono, nitrógeno y sales minerales adecuadas y en las condiciones apropiadas para su crecimiento, (2) someter a la suspensión de células a una extracción de la fracción proteica mediante sonicación del extracto, (3) seguida de un procedimiento de aislamiento de proteínas por sucesivas centrifugaciones y precipitaciones, con ajustes tanto del pH como de la fuerza iónica del medio, incluyendo preferentemente al menos una etapa de calentamiento y enfriamiento sucesivo en hielo, y (4) purificación por filtración en gel, isoelectroenfoque, intercambio iónico u otros medios equivalentes de purificación de proteínas extraídas a partir de cultivos de microorganismos.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende los siguientes pasos: (1) Cultivar bacterias de *Escherichia coli* en un medio nutritivo que consiste en 30 litros de medio mínimo M9 con glucosa 5 mM, (2) extracción de la fracción proteica consistente en una sedimentación de las bacterias anteriores mediante centrifugación, resuspensión del pellet bacteriano obtenido en Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 y MgCl₂ 5 mM, y sonicación del mismo, (3) aislamiento de las proteínas extraídas mediante una etapa de ultracentrifugación a 100.000 g, del extracto crudo bacteriano con posterior calentamiento del sobrenadante así obtenido durante 10 minutos a una temperatura de 58°C, seguido de enfriamiento en hielo, centrifugación y concentración de la proteína de dicho sobrenadante mediante precipitación en sulfato amónico, seguida de una nueva centrifugación y posterior resuspensión del pellet obtenido en Tris-HCl 50 mM pH 7.5 y (4) purificación por cromatografía de filtración en gel, intercambio iónico e isoelectroenfoque, de las proteínas así extraídas.
3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado** porque el microorganismo cultivado sobreexpresa un gen que codifica para el polipéptido con actividad AGPPasa.
4. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque como microorganismo se cultivan cepas puras de *E. Coli* CECT5357.
5. Procedimiento de obtención de *E. coli* CECT5357, **caracterizado** porque dicha cepa se obtiene a partir de la introducción en *E. coli* de un fragmento de ADN, representado por SEQ ID N°: 4 que comprende el gen aspP que codifica para el polipéptido representado en SEQ ID N°: 5 con función enzimática AGPPasa, fragmento de ADN que se amplifica por PCR desde el ADN genómico de *E. Coli* mediante dos cebadores obtenidos a su vez a partir de las regiones 5' y 3' del gen aspP, representados por SEQ ID N°: 2 y SEQ ID N°: 3 respectivamente.
6. Producto enzimático de origen microbiano procariota, denominado AGPPasa, con actividad enzimática ADPG pirofosfatasa EC 3.6.1.21 obtenible según el procedimiento de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** por catalizar la hidrólisis del ADPG equimolarmente en G1P y AMP, no hidrolizar moléculas con enlaces fosfomonoéster ni nucleótidos mono-, di- o tri-fosfatos tales como ATP, UTP, ADP, UMP, AMP, etc., requerir Magnesio para su actividad enzimática, inhibirse por molibdato y moléculas fosforiladas, estar su actividad negativamente afectada por agentes reductores y quelantes, ser muy estable a pH entre 7,5 y 8,5, y reconocer, además del ADPG, a la ADPribosa y ADPmanosa pero no a otros azúcares-nucleótidos tales como, entre otros, UDPglucosa o GDPmanosa.
7. Producto enzimático según la reivindicación 6, **caracterizado** por no hidrolizar, entre otros, G1P, G6P, AMP, 3-fosglicerato, AMPc, ni ácidos nucleicos de larga cadena tales como ADN o ARN.
8. Producto enzimático según las reivindicaciones 6 a 7, **caracterizado** por ser inhibido por pirofosfato inorgánico, y ésteres de fosfato tales como, entre otros, AMP, ADP, ATP, o 3-fosglicerato.
9. Producto enzimático según las reivindicaciones 6 a 8, **caracterizado** porque su actividad es afectada, entre otros, por el β-mercaptopetanol, EDTA, cisteína reducida o ascorbato.
10. Producto enzimático según las reivindicaciones 6 a 9, **caracterizado** por no reconocer como sustratos, entre otros, a la UDPglucosa, GDPglucosa, adenosina 5'-fosfatosulfato, o bis-p-nitrofenil-fosfato.
11. Producto enzimático según las reivindicaciones 6 a 10, **caracterizado** por presentar un peso molecular aparente determinado por filtración en gel en torno a 40-50 kDa, así como por mostrar una K_m para ADPG de 0,15 mMolar.
12. Producto enzimático según las reivindicaciones 6 a 11, **caracterizado** por haber sido aislado a

partir de *E. coli*.

13. Producto enzimático según las reivindicaciones 6 a 12, **caracterizado** porque contiene en su secuencia al menos un fragmento polipeptídico representado en SEQ ID N°: 1.

5 14. Secuencia nucleotídica representada como SEQ ID N°: 4 que comprende el gen aspP y cualquier secuencia nucleotídica derivada por efecto de la degeneración del código genético y/o capaz de hibridar con ella y que codifique para un polipéptido representado como SEQ ID N°: 5, con actividad enzimática AGPPasa, utilizable en el procedimiento de la reivindicación 5.

10 15. Uso del producto enzimático de las reivindicaciones 6 a 13, en la fabricación de dispositivos y/o composiciones de ensayo de aplicación en la determinación del ADPG.

15 16. Uso según la reivindicación anterior, **caracterizado** porque la determinación del ADPG se basa en la G1P liberada durante la reacción catalizada por la AGPPasa.

20 17. Uso según la reivindicación 16, **caracterizado** porque la G1P liberada es sometida al enzima fosfoglucomutasa para producir G6P, que a su vez se hace reaccionar acopladamente con NAD⁺, por acción del enzima G6P deshidrogenasa, obteniéndose 6-fosfogluconato y NADH, determinables por métodos espectrofotométricos, fluorométricos o de otra naturaleza, convencionales.

18. Uso de la secuencia génica de la reivindicación 14, en la obtención de plantas transformadas que sobreexpresan el gen aspP de la enzima AGPPasa de *E. coli*.

25 19. Uso según la reivindicación anterior, **caracterizado** por utilizar un vector de transformación que contenga un plásmido que incluya el gen aspP de dicha AGPPasa.

20 20. Uso según la reivindicación 19, **caracterizado** porque el vector de transformación es *Agrobacterium tumefaciens*.

30 21. Uso según la reivindicación 20, **caracterizado** porque el vector de transformación son cepas puras de *Agrobacterium tumefaciens* CECT5901.

35 22. Uso según las reivindicaciones 19 a 21, **caracterizado** porque la planta transformada es una dicotiledónea y preferentemente tomate, patata o tabaco.

23. Plantas transformadas **caracterizadas** por sobreexpresar el gen de AGPPasa.

40 24. Plantas transformadas según la reivindicación 23 **caracterizadas** porque la sobreexpresión del gen aspP se consigue introduciendo una secuencia que lo contenga en el genoma de la planta mediante un vector de transformación, preferentemente *Agrobacterium tumefaciens* y más preferentemente *A. tumefaciens* CECT5901, que contenga un plásmido que incluye el gen aspP de la AGPPasa de *E. coli*.

45 25. Plantas transformadas según las reivindicaciones 23 o 24, **caracterizadas** por ser plantas dicotiledóneas y preferentemente tomate, patata o tabaco.

26. Plantas transformadas según las reivindicaciones 23 a 25 **caracterizadas** por presentar un fenotipo con reducido contenido en almidón y resistentes a salinidad alta.

50

55

60

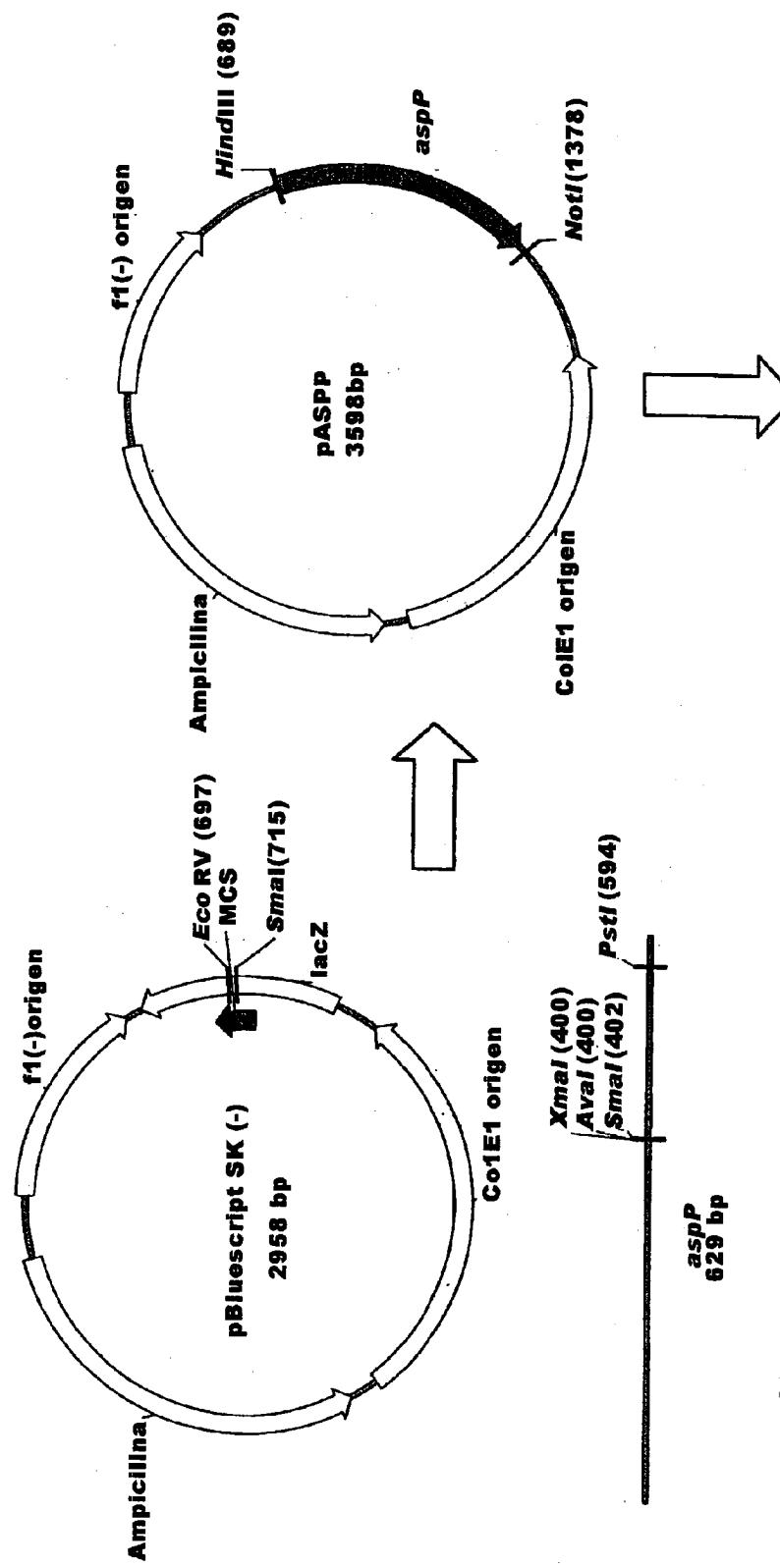


FIGURA 1A

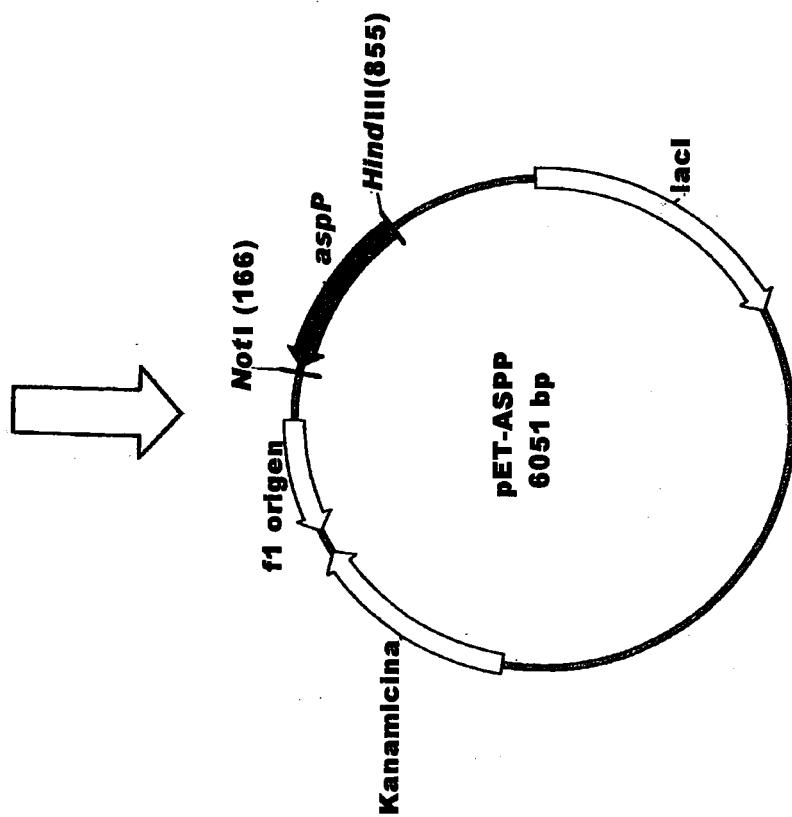


FIGURA 1B

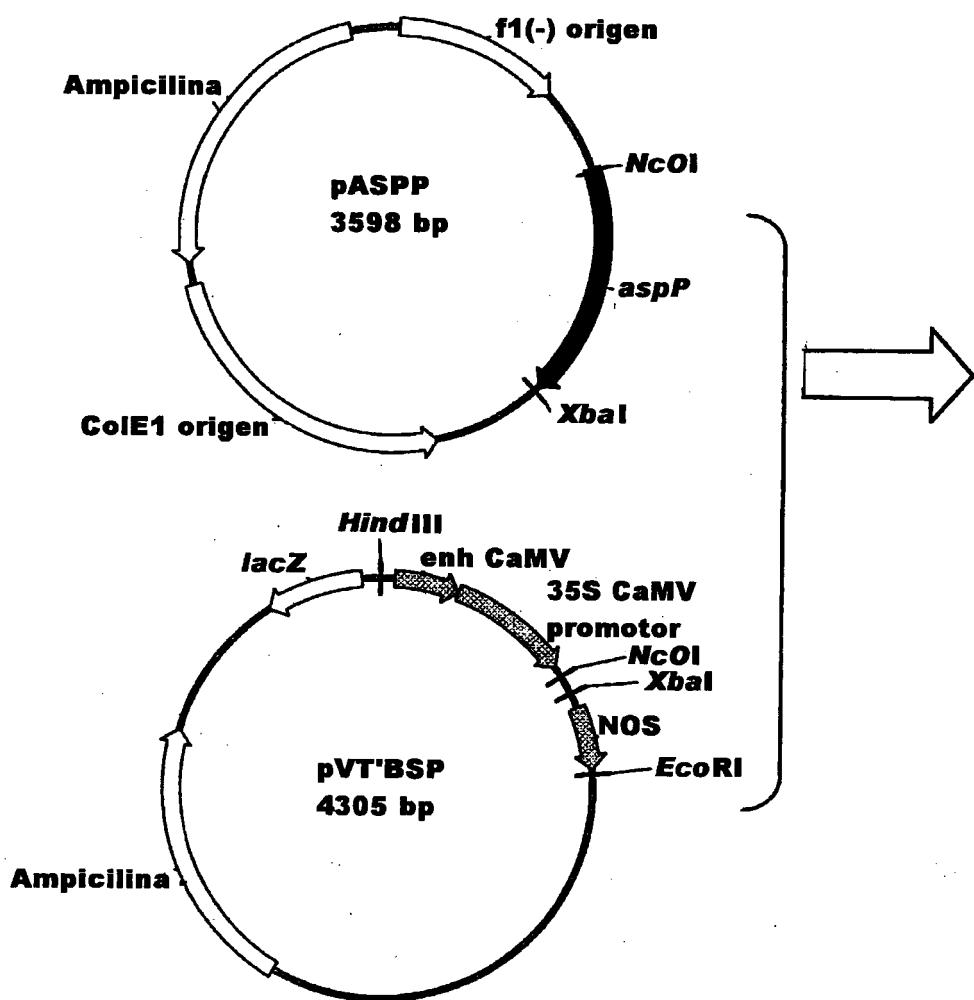


FIGURA 2A

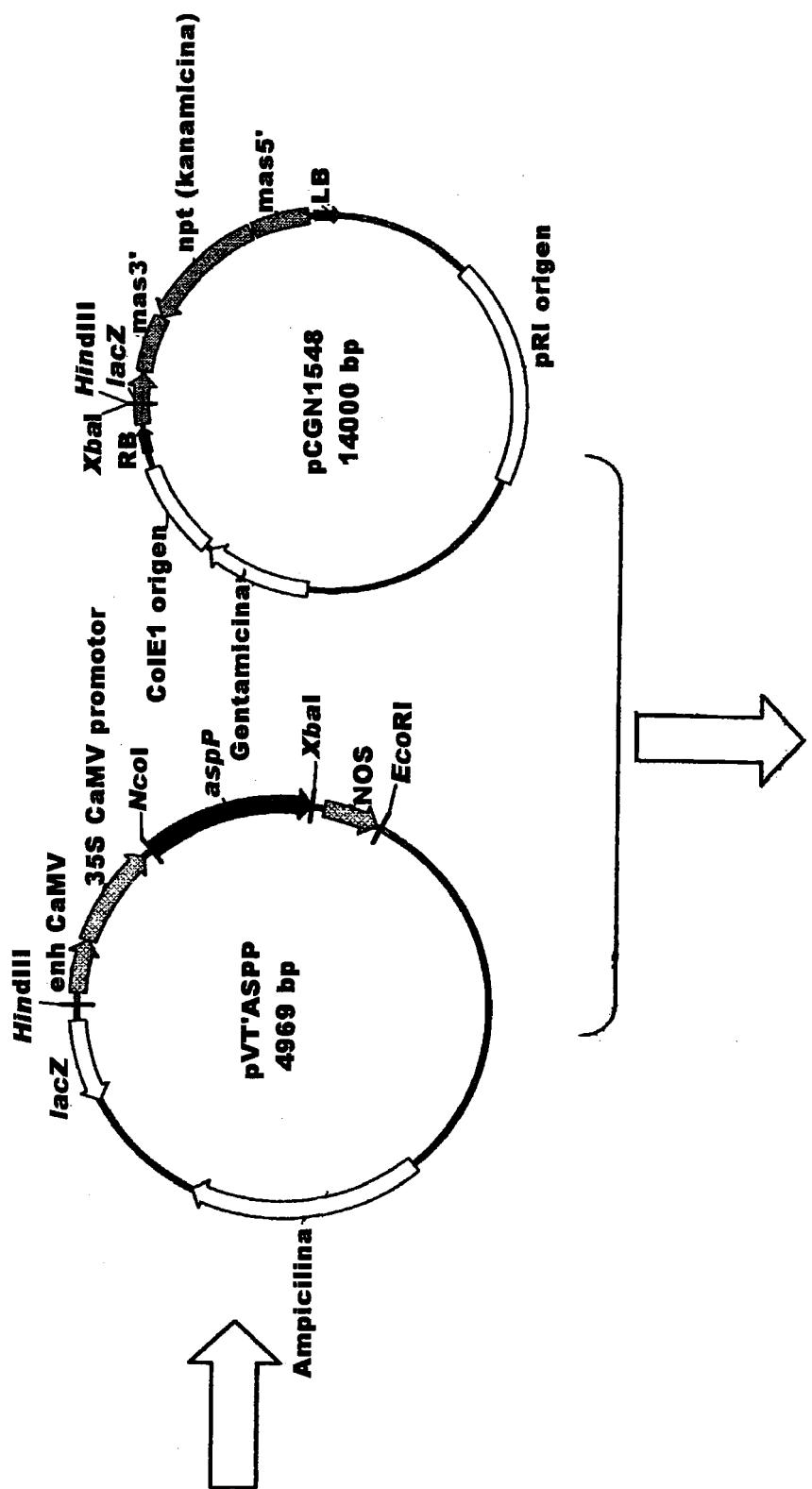


FIGURA 2B

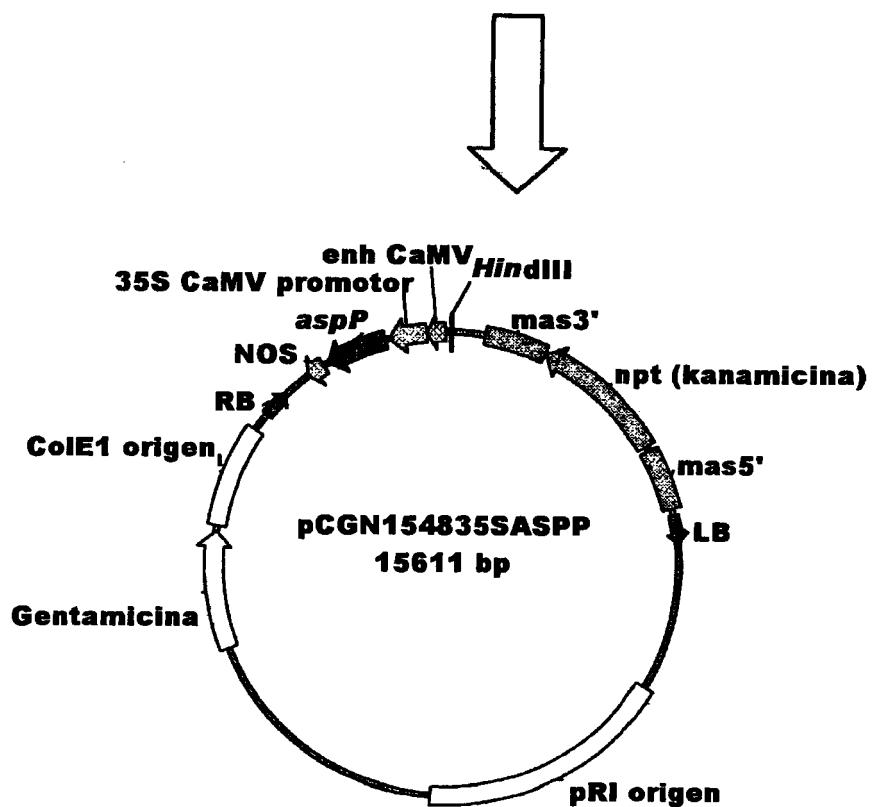


FIGURA 2C

ES 2 190 870 B1

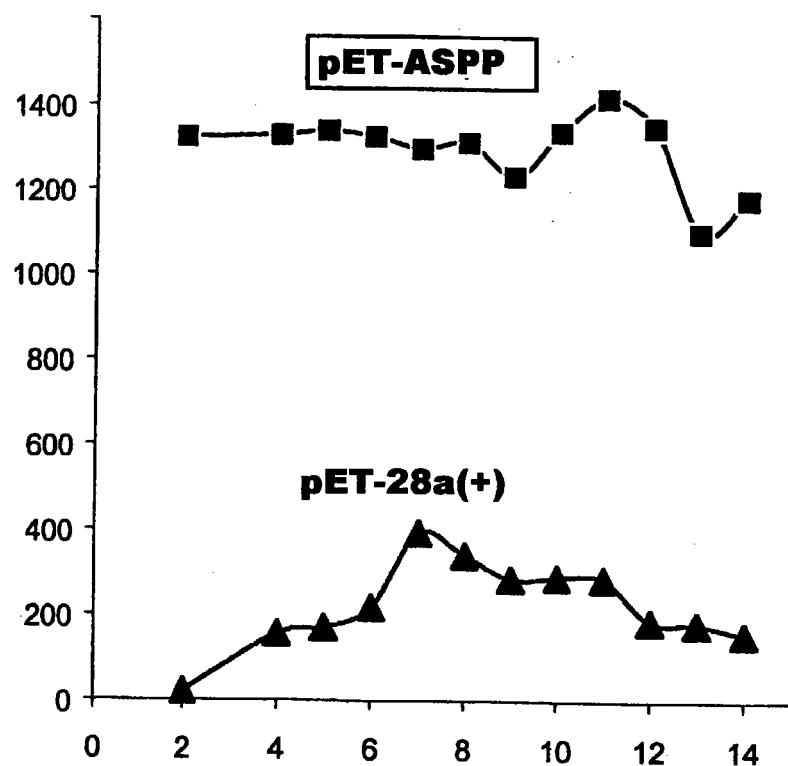


FIGURA 3

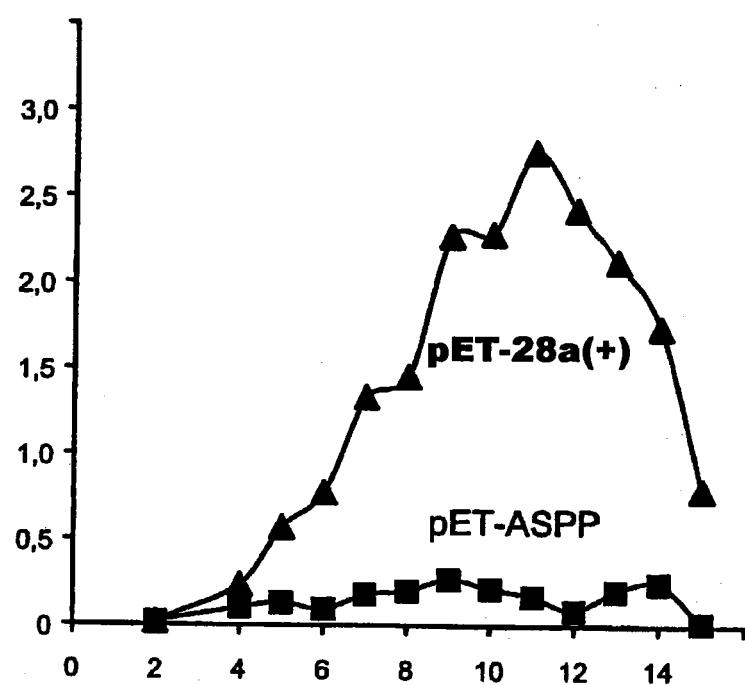


FIGURA 4

ES 2 190 870 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD PUBLICA DE NAVARRA

5 <120> "ADPglucosa pirofosfatasa bacteriana, procedimiento de obtención, uso en la fabricación de dispositivos de ensayo y en la obtención de plantas transgénicas.

<130> P-99577

10 <160> 9

<210> 1

<211> 20

15 <212> Péptido

<213> *Escherichia coli* BL21

20 <220>

<223> Extremo N-terminal de AGPPasa

<400>

25 Met Val Lys Pro Asp Ser Leu Pro Val Thr Phe Gly Lys Asn Asp
5 10 15
Val Glu Ile Ile Ala
20

30 <210> 2

<211> 30

<212> ADN

35 <213> *Escherichia coli* BL21

<220>

40 <223> Cebador de la región 5' de *aspP*

<400>

45 atggtaagccagacagcctgccgttaca 30
<210> 3

<211> 30

50 <212> ADN

<213> *Escherichia coli* BL21

<220>

55 <223> Cebador de la región 3' de *aspP*

<400>

60 ttatccccactcatttttaacgcttgatg 30
<210> 4

ES 2 190 870 B1

<211> 233

<212> ADN

5 <213> *Escherichia coli* BL21

<220>

<223> gen *aspP*

10 <400>

```

atg gtt aag cca gac agc ctg ccc gtt aca ttt ggc aaa aac 42
gat gta gaa att att gca cga gaa aca ctt tat cgc ggc ttt 84
15 ttt tca tta gat ctt tat aga ttt cgt cat cgt cta ttc aac 126
ggg caa atg agt cat gag gta cgg cgg gaa att ttt gag cgc 168
ggt cac gcc gca gtc ttg cta ccc ttt gac cca gtg cgt gat 210
gaa gtt gtg ctg att gag cag att cgg att gcc gcg tac gac 252
acc agc gaa acc ccc tgg cta ctg gag atg gtt gcc ggg atg 294
20 att gaa gag ggt gaa agt gtg gaa gat gtt gcc cgt cgc gaa 336
gcg att gaa gag gcg gga ctg ata gtc aaa cgg acc aaa ccg 378
gtg tta agt ttc ctg gca agc ccg ggg ggc acc agt gag cgt 420
tcg tca att atg gtg ggc gaa gtg gac gcc acg acc gca agc 462
ggt att cat ggt ctg gct gat gaa aac gaa gat att cgc gtt 504
25 cat gtg gta agc cgg gaa cag gca tac cag tgg gta gaa gag 546
ggg aaa atc gac aac gca gcg tcg gtc atc gct ttg caa tgg 588
ctg cag ctg cat cat gcg tta aaa aat gag tgg gca taa 630

```

<210> 5

30 <212> proteína

<213> *Escherichia coli* BL21

35 <220>

<223> AGPPasa deducida de *aspP*

<400>

| | | | | | |
|----|---|-----|-----|-----|-----|
| 40 | Met Val Lys Pro Asp Ser Leu Pro Val Thr Phe Gly Lys Asn Asp Val Glu Ile Ile Ala | 5 | 10 | 15 | 20 |
| | Arg Glu Thr Leu Tyr Arg Gly Phe Phe Ser Leu Asp Leu Tyr Arg Phe Arg His Arg Leu | 25 | 30 | 35 | 40 |
| 45 | Phe Asn Gly Gln Met Ser His Glu Val Arg Arg Glu Ile Phe Glu Arg Gly His Ala Ala | 45 | 50 | 55 | 60 |
| | Val Leu Leu Pro Phe Asp Pro Val Arg Asp Glu Val Val Leu Ile Glu Gln Ile Arg Ile | 65 | 70 | 75 | 80 |
| 50 | Ala Ala Tyr Asp Thr Ser Glu Thr Pro Trp Leu Leu Glu Met Val Ala Gly Met Ile Glu | 85 | 90 | 95 | 100 |
| | Glu Gly Glu Ser Val Glu Asp Val Ala Arg Arg Glu Ala Ile Glu Glu Ala Gly Leu Ile | 105 | 110 | 115 | 120 |
| 55 | Val Lys Arg Thr Lys Pro Val Leu Ser Phe Leu Ala Ser Pro Gly Gly Thr Ser Glu Arg | 125 | 130 | 135 | 140 |
| | Ser Ser Ile Net Val Gly Glu Val Asp Ala Thr Thr Ala Ser Gly Ile His Gly Leu Ala | 145 | 150 | 155 | 160 |
| 60 | Asp Glu Asn Glu Asp Ile Arg Val His Val Val Ser Arg Glu Gln Ala Tyr Gln Trp Val | 165 | 170 | 175 | 180 |
| | Glu Glu Gly Lys Ile Asp Asn Ala Ala Ser Val Ile Ala Leu Gln Trp Leu Gln Leu His | 185 | 190 | 195 | 200 |
| | His Gln Ala Leu Lys Asn Glu Trp Ala | 205 | | | |



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- (11) ES 2 190 870
(21) N° de solicitud: 200100844
(22) Fecha de presentación de la solicitud: 10.04.2001
(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) Int. Cl.7: C12N 9/16, 15/55, 1/21, A01H 5/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| E | MORENO-BRUNA et al. "adenosine diphosphate sugar pyrophosphatase prevents glycogen biosynthesis in Escherichia coli", Julio 2001, PNAS, Vol. 98 (14), páginas 8128-8132. | 1-17 |
| A | DUNN, C.A. et al. "Studies on the ADP-ribose pyrophosphatase subfamily of the Nudix hydrolases and tentative identification of TrkB1 a gene associated with tellurite resistance", 1999, Journal of Biological Chemistry, Vol. 274 (45), páginas 32318-32324. | 1-26 |
| A | HANJING YANG et al. "Cloning and characterization of a new member of the Nudix Hydrolases from human and mouse", 2000, Journal of Biological Chemistry, Vol. 275, páginas 8844-8853. | 1-26 |
| A | CA 2035369 A (BURRELL et al.) 01.08.1992, página 5, línea 7 - página 9, línea 23. | 19-23 |

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 nº:

| | | |
|--|-------------------------------|---------------|
| Fecha de realización del informe 24.07.2003 | Examinador E. Relaño Reyes | Página 1/1 |
|--|-------------------------------|---------------|