

4.5 Fitohormones relacionades amb la resposta defensiva

Totes les respostes defensives estan regulades mitjançant una complexa xarxa de transmissió de senyals, on hi juguen un paper vital les fitohormones: l'àcid salicílic (SA, *salicylic acid*), l'àcid jasmònic (JA, *jasmonic acid*), la sistemina, l'àcid abscísic (ABA, *abscisic acid*) i l'etilè (C₂H₄). Així mateix, s'ha descrit que els senyals físics, de tipus elèctric o hídric, també podrien activar la resposta sistèmica (Wildon *et al.*, 1992).

La implicació de les citades hormones és crucial per a la inducció de la resposta defensiva front insectes herbívors i patògens: l'àcid jasmònic està involucrat en la resposta a ferida (que implica l'activació de la via dels àcids octadecanoides), i l'àcid salicílic està implicat en la percepció de l'atac de patògens de moltes espècies vegetals (resposta hipersensible, HR, i resistència sistèmica adquirida, SAR) (Farmer & Ryan, 1992; Sticher *et al.*, 1997).

L'àcid abscísic (ABA) té un paper important en la resposta a ferida, sobretot en els primers esdeveniments de la resposta defensiva. Sembla ser que, l'ABA (fitohormona que també actua en situacions d'estrès salí, o en la inhibició la germinació de les llavors) es sintetitzaria *de novo* en la zona ferida, i que aquesta síntesi estaria relacionada amb la dessecació dels teixits ferits (Reymond *et al.*, 2000). L'ABA podria actuar estimulando una lipasa membranar, que facilitaria l'alliberament de l'àcid linoleic a partir de fosfolípids de membrana (desencadenant així, la ruta dels àcids octadecanoides que condueix a la producció de JA) (Peña-Cortés *et al.*, 1996).

L'etilè, és una fitohormona reguladora de processos importants en diferents estadis de desenvolupament de la planta (l'elongació cel·lular, la germinació de llavors, la maduració de fruits, la senescència...); l'etilè sembla implicat en la percepció de l'estrès, tant biòtic com abiòtic, i presenta sinergia amb el JA: s'ha descrit que indueix l'expressió de gens de defensa i, en algun cas en resposta a ferida mecànica, tal com ho fa el JA (Xu *et al.*, 1994; O'Donnell *et al.*, 1996; Tornero *et al.*, 1997; Penninckx *et al.*, 1998).

La sistemina és un pèptid de 18 aminoàcids generat a partir d'una proteïna precursora, la prosistemina. Diferents estudis han demostrat la importància d'aquesta molècula en la resposta a ferida, i la transmissió de la resposta sistèmica, en solanàcies (Ryan & Pearce, 1998; Ryan, 2000; Moura & Ryan, 2001; León *et al.*, 2001). En resposta a ferida, la sistemina podria alliberar-se en l'apoplast, on interaccionaria amb un receptor de membrana, desencadenant finalment una xarxa de senyals intracel·lulars (activació de proteïnes kinasa, de la fosfolipasa A₂ i l'alliberament d'àcid linoleic) que conduirien a la producció d'àcid jasmònic, i aquest a l'expressió de gens de defensa (Schaller & Frasson, 2001).

Les diferents vies de transmissió de senyals desemboquen en l'expressió dels diferents gens de defensa de la planta, tant per a respostes directes com indirectes, discernint entre els possibles organismes atacants, la intensitat de l'agressió i enviant senyals a les altres

plantes no ferides perquè reaccionin abans de l'atac. Així mateix la resposta pot ser local (restringida a la zona on s'ha produït l'atac) i/o sistèmica (en fulles o parts de la planta que no han estat atacades directament).

Cal destacar que les diferents rutes de senyalització mitjançades per aquestes fitohormones, interaccionen entre elles; i que aquestes interaccions poden tenir un efecte de sinergisme (Stout *et al.*, 1999) o d'antagonisme (Felton *et al.*, 1999; Maleck & Dietrich, 1999; Thomma *et al.*, 1998). L'existència d'aquesta multiplicitat de vies de senyalització, i de connexions entre les mateixes, explicaria els efectes creuats que s'observen front diferents organismes potencialment perjudicials per a la planta (patògens, insectes fitòfags) (Schweizer *et al.*, 1997; Clarke 1998).

5. Resposta defensiva front l'atac d'insectes

Les respostes de defensa de les plantes són doncs desencadenades per diferents estímuls, i segueixen vies de transmissió de senyals complexes. Malgrat les moltes interconnexions que existeixen entre la resposta defensiva front insectes i la resposta front patògens, es pot definir de manera general, la cadena d'esdeveniments de la resposta de defensa front insectes.

En la *Figura 12*, es sintetitza la cadena d'esdeveniments que es dona en la planta en resposta a l'atac d'insectes herbívors. El procés s'inicia per la ferida que produeix l'insecte en alimentar-se de la planta, que desencadenarà tot un seguit de senyals, tant locals com sistèmics. Els senyals locals inclouen oligosàcarids provinents del trencament de la paret cel·lular de la planta, o molècules de la secreció bucal de l'insecte, com per exemple la *volicitina*. Com a senyals sistèmics actuen senyals de tipus físic (elèctrics o hídrics), la fitohormona ABA i/o la sistemina. Es pressuposa que, aquests diferents senyals, poden ser reconeguts pels seus corresponents receptors de membrana (actualment encara existeix poca informació al respecte).

La *volicitina* podria desencadenar l'emissió de compostos orgànics volàtils per part de la planta atacada. L'emissió d'aquests compostos té com a objectiu el control de la població d'insectes fitòfags. El més sorprenent però, ha estat conèixer les estratègies que segueix la planta, mitjançant aquests compostos volàtils, per fer minvar la població de l'insecte que l'està atacant: certs compostos poden atraure altres insectes depredadors o insectes paràsits de la plaga que s'està alimentant de la planta (Pare & Tumlinson, 1999; Dicke & Van Loon, 2000; Van Poecke *et al.*, 2001). Altres compostos volàtils són alliberats per a dissuadir, a determinats lepidòpters, de pondre els ous en les plantes ferides (De Moraes *et al.*, 2001); també s'ha descrit compostos volàtils que s'alliberen quant hi ha un insecte que diposita els ous, i que atrauen a himenòpters paràsits dels ous (Meiners & Hilker, 2000).

Recentment s'ha descobert unes altres molècules que també actuen com a desencadenant de la resposta defensiva de plantes front insectes; aquestes molècules són les anomenades *bruchins*, diols de cadena llarga modificats per l'àcid 3-hidroxiopropanoic, segregades per determinats escarabats al pondre els ous en les fulles de plantes de pèsol. Les *bruchins* desencadenen el creixement neoplàstic de la zona on hi ha hagut la deposició dels ous, formant tumors que faran desenganxar-se l'ou i exposarà a la larva neonatal a predadors, paràsits o a la dessecació (Doss *et al.*, 2000). Així mateix, recentment s'ha demostrat que l'emissió de certs compostos permet la comunicació aèria entre plantes ferides i plantes no ferides, conduint a l'expressió de gens de defensa en aquestes últimes (Arimura *et al.*, 2000; Dicke & Bruin, 2001).

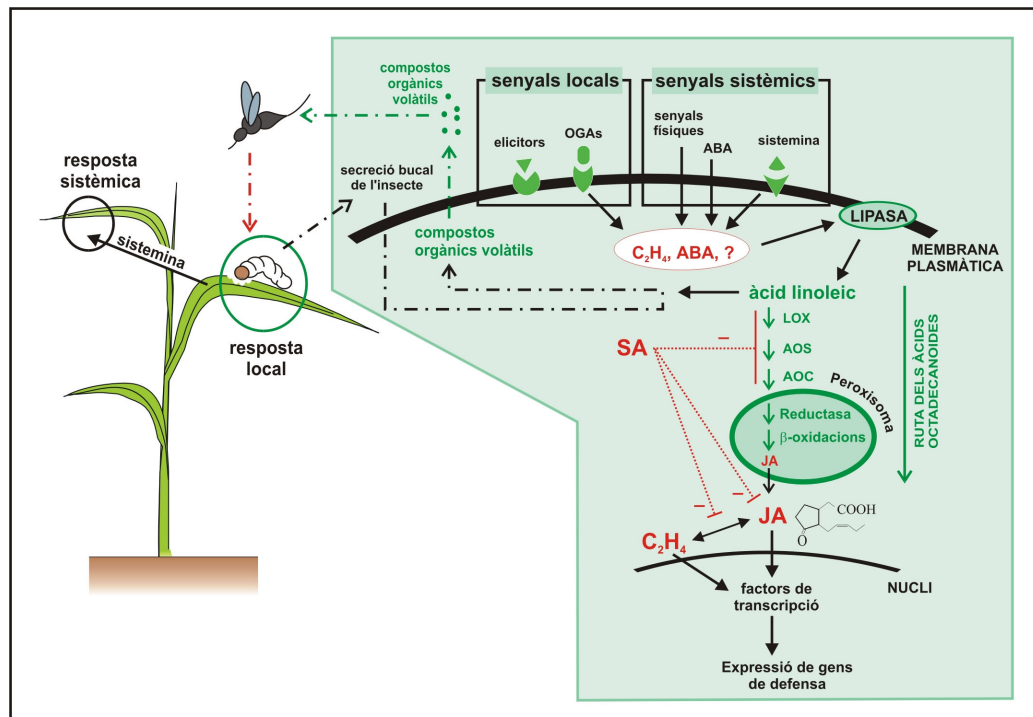


Figura 12: Resposta defensiva de plantes front l'atac d'insectes. OGAs, oligosàcarids; ABA, àcid abscísic; C₂H₄, etilè; LOX, lipooxigenasa; AOS, alen òxid sintasa; AOC, alen òxid ciclasa; SA, àcid salicílic; JA, àcid jasmònic. (Koiwa *et al.*, 1997; Walling, 2000).

Així, una vegada rebut el senyal de ferida a nivell de membrana plasmàtica, es requereixen unes molècules i/o activitats que condueixin fins a l'activació d'una lipasa membranar, que facilitaria l'alliberament de l'àcid linoleic a partir dels fosfolípids de membrana. L'àcid linoleic és el precursor de la via dels àcids octadecanoides; via que condueix a la formació de l'àcid jasmònic. Sembla ser que la *volicitina* podria induir la formació de compostos orgànics volàtils. Aquesta molècula és estructuralment molt semblant a l'àcid linoleic, i es creu que podria actuar de manera semblant (Albor *et al.*, 1997).

Amb l'àcid linoleic s'iniciaria la ruta que condueix a la formació del JA; una bona part de les etapes d'aquesta ruta són conegudes (Hildmann *et al.*, 1992; Peña-Cortés *et al.*, 1994; León *et al.*, 2001; Weber, 2002), i els enzims que les duen a terme han estat aïllats i caracteritzats (Bell & Mullet, 1993; Creelman & Mullet, 1997). En la *Figura 13* es mostra la ruta de biosíntesi del (-)-JA.

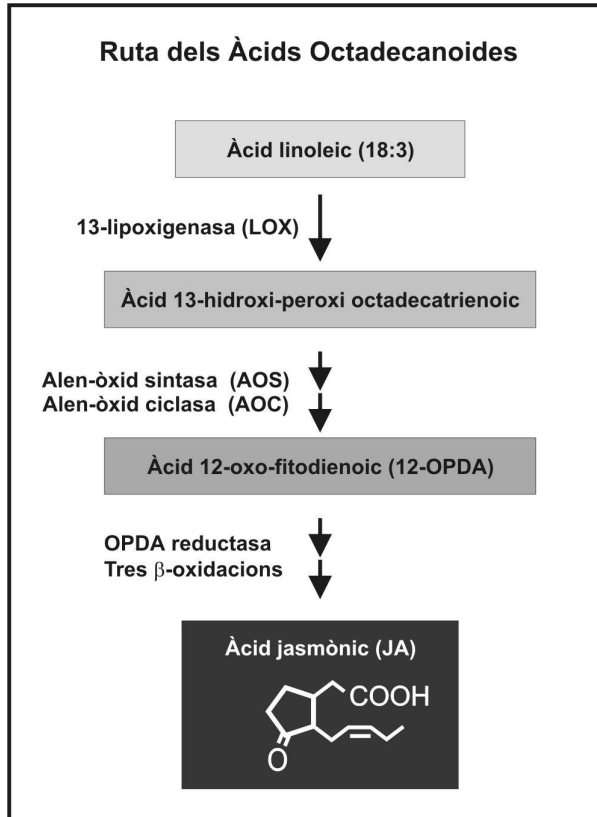


Figura 13: Ruta de biosíntesi de l'Àcid Jasmònic (JA): ruta dels Àcids Octadecanoides. S'indiquen els productes intermediaris (requadres) i els enzims implicats (Adaptat de Walling, 2000).

Breument, a partir de l'àcid linoleic, una 13-lipooxigenasa (LOX), una alen-òxid sintasa (AOS) i una alen-òxid ciclasa (AOC) condueixen a la formació de l'àcid 12-oxo-fitodienoic (12-OPDA). A partir d'aquest àcid, i mitjançant una reducció i tres passos de β - oxidació successius, es forma l'àcid jasmònic (-)-JA.

L'estructura química del JA consisteix en una molècula de ciclopentanona, amb dues cadenes laterals d'àtoms de carboni. L'esterificació del C-1 amb un grup metil donarà el metiljasmonat,

MeJA. El JA, i el seu metil-èster MeJA, junt amb les conjugacions d'isoleucina, valina o leucina amb (-)-JA, són molècules fisiològicament actives com a fitoreguladors: es veuen implicades en la regulació de gran nombre de processos morfològics i fisiològics (resposta a estrès hídric, inhibició del creixement, inducció a la senescència foliar, maduració de fruits...) a part del seu paper en la resposta defensiva de plantes (Sembdner & Parthier, 1993).

En aquest punt de la transducció del senyal, el JA actuaria induint l'expressió de diferents gens de defensa, entre ells els inhibidors de proteases. L'etilè sembla actuar en aquest punt, activant també l'expressió de gens de defensa. Contràriament, l'àcid salicílic actuaria de forma antagònica al JA o a l'etilè: el SA actuaria inhibint els primers passos de la ruta dels àcids octadecanoides i posteriorment inhibint, o bé la inducció de factors de transcripció per part del JA o l'etilè, o bé la sinergia entre aquestes dues fitohormones (Walling *et al.*, 2000).

Les primeres etapes de la ruta dels àcids octadecanoides, és a dir els passos en què intervenen els enzims LOX, AOS i AOC, es podrien donar en l'interior dels cloroplasts, però

les reduccions i β -oxidacions posteriors, fins a la formació de l'àcid jasmònic, es produïrien en els peroxisomes. Actualment no es tenen evidències experimentals per demostrar el pas del producte intermediari des dels cloroplasts als peroxisomes (Weber, 2002).

L'aplicació exògena de JA o MeJA indueix fortament l'expressió local i sistèmica dels gens dels inhibidors de proteases en gran nombre d'espècies de plantes. Aquesta ubiqüitat indica la conservació de la resposta en espècies més o menys allunyades filogenèticament (Wasternack *et al.*, 1997). A més a més, estudis amb mutants deficients per precursors del JA o estudis del bloqueig de la ruta dels àcids octadecanoides confirmen el paper del JA ja que, d'una banda, aquests mutants presenten una supressió de l'expressió de JA i dels gens de determinats inhibidors de proteases en resposta a ferida i, d'altra banda, són més sensibles a l'atac d'insectes (Hildmann *et al.*, 1992; Bergey *et al.*, 1996; Howe *et al.*, 1996; Peña-Cortés *et al.*, 1996).

En la darrera dècada, l'àcid jasmònic ha estat la molècula que ha centrat l'interès de les investigacions sobre les oxilipines; tanmateix existeixen altres classes d'oxilipines, actualment en estudi, que semblen implicades en la resposta de plantes a patògens. Les oxilipines són metabolits produïts per les plantes mitjançant la transformació oxidativa d'àcids grassos insaturats, que es dona per una sèrie de vies metabòliques divergents. L'estudi a nivell bioquímic i genètic, a permès evidenciar que aquests derivats oxigenats actuen activament en els mecanismes de defensa de plantes (Hamberg *et al. et al.*, 1999; De León *et al.*, 2002; Blée, 2002). Entre les primeres oxilipines antifúngiques caracteritzades hi ha els derivats epoxi- i hidroxí- de l'àcid linoleic; per altra banda, entre les oxilipines implicades en la resposta defensiva a plagues i patògens hi ha els derivats de la digestió via CYP74B, com els àcids colneleic i colnelenic (implicats en resposta a fongs i virus en patata) o aldèhids de cadena curta (implicats en resposta a insectes xucladors, que actuarien reduint la fecunditat dels àfids) (Blée, 1998; Weber *et al.*, 1999; Vancanneyt *et al.*, 2001; De León *et al.*, 2002).

La via de transmissió i resposta a ferida produïda per insectes, sol variar lleugerament per diferents plantes estudiades: en el cas d'*Arabidopsis*, existeixen gens que s'indueixen per ferida però que, en canvi, no s'indueixen per JA, tal i com ho fan els seus homòlegs en solanàcies (Titarenko *et al.*, 1997); així mateix, la fitohormona etilè en *Arabidopsis*, es perfila com a regulador i no com a molècula inductora principal, com és ara el JA (Rojo *et al.*, 1999).

Així mateix, cal destacar els estudis realitzats per Reymond i col·laboradors, en què mitjançant la tècnica de *microarrays* d'ADNc, han comparat l'expressió de gens en resposta a ferida mecànica *versus* ferida produïda durant l'alimentació d'insectes (Reymond *et al.*, 2000). Així han pogut determinar que els perfils de transcripció de diferents gens

d'*Arabidopsis*, varien segons la planta hagi sigut ferida mecànicament o bé ferida per l'alimentació de larves de *Pieris rapae* en les seves fulles.

5.1 Els inhibidors de proteases

Els inhibidors de proteases (IPs) es troben entre les principals proteïnes defensives que les plantes acumulen per fer front a l'atac d'insectes i d'alguns microorganismes. Els IPs constitueixen la família PR-6 de les proteïnes PR. S'acumulen en teixits de reserva, com llavors o tubercles, però també poden ser presents en les parts aèries de la planta mitjançant la inducció per diversos estímuls, com és ara la inducció per ferida; en aquest cas, la producció d'IPs es dona per la via dels àcids octadecanoides, que catalitza el trencament de l'àcid linoleic i la formació d'àcid jasmònic, que induirà l'expressió dels gens codificants pels inhibidors de proteases.

Els IPs de plantes són proteïnes de baix pes molecular. Es classifiquen segons el tipus de proteasa que inhibeixen i en base a la seva seqüència d'aminoàcids. S'han descrit quatre tipus diferents de proteases basant-se en l'aminoàcid que ocupa el centre actiu o mecanisme catalític: serin-, cisteïn-, aspartil- o metal·loproteases (Koiwa *et al.*, 1997). En la *Taula 14*, es mostra la classificació per famílies dels IPs de plantes.

Famílies d'inhibidors de proteases de plantes	
Família	Proteasa inhibida
Inhibidors de serinaproteases	tripsina, quimotripsina i/o
▪ Inhibidor de tripsina de soja (Kunitz) STKI	elastasa
▪ Inhibidor Bowman-Birk	
▪ Inhibidor de tripsina d'ordi BTI	
▪ Inhibidor de patata I	
▪ Inhibidor de patata II	
▪ Inhibidor de carbassa	
▪ Inhibidor de tripsina Ragi I-2/blat de moro	
▪ Serpina	
Inhibidors de cisteïnaproteases	papaïna; catepsines B, H, L
Inhibidors d'aspartilproteases	catepsina D
Inhibidors de metal·loproteases	carboxipeptidases A, B

Taula 14: Famílies dels inhibidors de proteases de plantes en base al seu mecanisme catalític, i proteases que inhibeixen. S'indiquen els principals grups de serinaproteases, segons Ryan (1990).

Així mateix, en relació a l'estructura primària, s'ha establert una classificació en 10 famílies, que es mostra en la *Taula 15*.

L'activitat dels IPs ve donada per la seva capacitat de formar complexos estables amb les proteases diana, bloquejant, alterant o evitant l'accés del substrat al centre actiu de l'enzim. Els inhibidors de serinaproteases són el grup més àmpliament representat en plantes; totes les famílies d'inhibidors de serinaproteases són inhibidors competitiu; així utilitzen un bucle, que exposa el centre reactiu, que insereixen en la cavitat del centre actiu de la proteasa, simulant el mode d'acció del substrat, bloquejant d'aquesta manera el centre catalític de la serinaproteasa (Laskowski & Kato, 1980).

Famílies d'inhibidors de proteases de plantes segons la seva estructura primària
▪ Inhibidors de serinaproteases Bowman-Birk
▪ Inhibidors de tripsina/ α -amilasa de cereals
▪ Inhibidors de cisteïnoproteases
▪ Inhibidors de metal·locarboxipeptidases
▪ Inhibidors de tripsina de mostassa
▪ Inhibidors de patata de tipus I
▪ Inhibidors de patata de tipus II
▪ Serpines
▪ Inhibidors de tripsina de soja (Kunitz)
▪ Inhibidors de carbassa

Taula 15: Classificació dels inhibidors de proteases de plantes en famílies, segons la seva estructura primària, segons De Leo & Gallerani (2002).

El tipus d'interacció més estudiat és el que es dona entre les serinaproteases (principalment serinaproteases de mamífers) i els seus inhibidors. Les interaccions entre l'inhibidor i el lloc d'unió de la proteasa s'estabilitzen mútuament i són tan estretes que donen una gran estabilitat al complex (Bode & Huber, 2000). El bucle on hi ha el centre reactiu de l'inhibidor conté els residus anomenats P1-P1' (veure *Figura 16*); el residu P1 de l'inhibidor determina el tipus específic de serinaproteasa que inhibeix.

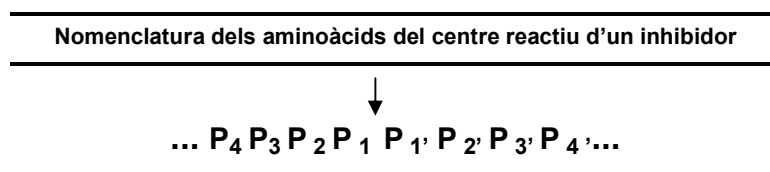


Figura 16: Nomenclatura dels aminoàcids localitzats en el centre reactiu d'un inhibidor. La fletxa indica l'enllaç peptídic que és reconegut per la proteasa, i hidrolitzat per aquesta en el seu substrat natural.

Per a cada inhibidor, l'aminoàcid P1 és un o varis aminoàcids determinats, que es corresponen amb els residus que són reconeguts per la proteasa en els seus substrats naturals. Altres residus, propers al centre reactiu, també tenen un paper important per determinar la força de la interacció inhibidor – proteasa (De Leo & Gallerani, 2002).

La majoria dels inhibidors estudiats pertanyen a tres famílies de plantes: les lleguminoses, les solanàcies i les gramínies (Richardson, 1991). L'activitat defensiva dels IPs de plantes es basa en la seva capacitat d'inhibició per les proteases presents en l'intestí de l'insecte atacant, reduint així l'assimilació i disponibilitat d'aminoàcids necessaris per al creixement i desenvolupament de l'insecte. Els IPs també poden presentar activitat defensiva contra nemàtodes (Williamson & Hussey, 1996). Així mateix, s'ha descrit l'activitat antifúngica de certs IPs, que poden inhibir el creixement d'hifes o la germinació d'espores de certs fongs fitopatògens (Lorito *et al.*, 1994; Dunaevskii *et al.*, 1997; Joshi, 1998).

Gran nombre d'espècies vegetals han estat transformades amb gens d'inhibidors de proteases i assajades per determinar-ne la millora de la resistència contra insectes (veure *Apartat 8.1*). Certs estudis però, han pogut constatar el fet que els insectes són capaços d'adaptar-se a la presència d'IPs expressats en plantes transgèniques, modificant les seves activitats proteolítiques digestives i sobreexpressant proteases insensibles a l'inhibidor producte del transgen (Broadway, 1995; Michaud *et al.*, 1996; Jongsma & Bolter, 1997).

Basant-se en aquestes característiques defensives, s'han realitzat nombrosos estudis per determinar l'activitat contra plagues de diferents IPs. La *Taula 17* mostra alguns dels IPs que s'han aïllat i estudiat en referència a la seva activitat contra plagues (insectes i nemàtodes).

Així doncs, es fan necessaris estudis que permetin determinar les característiques d'aquests canvis adaptatius en insectes, així com la recerca de nous IPs bifuncionals o multifuncionals (que presentin activitat inhibidora contra diferents tipus de proteases) facin més difícil un procés d'adaptació en l'insecte.

Tipus d'inhibidor	Plaga	Referència
Soybean trypsin inhibitor	<i>Tribolium castaneum</i>	Oppert 1993
Bowman-Birk	<i>Teleogryllus commodus</i>	Burgess 1991
Barley trypsin inhibitor	<i>Spodoptera exigua</i>	Lara 2000
Kunitz	<i>Helicoverpa armigera</i>	Johnston 1993 Ishikawa 1994
	<i>Spodoptera litura</i>	McManus 1995
	<i>S.exigua</i>	Broadway 1986b
Potato protease inhibitors	<i>Sesamia inferens</i>	Duan 1996
Potato inhibitor II	<i>Chrysodeixis erisoma</i>	Mc Manus 1994
	<i>T. commodus</i>	Burgess 1991
Maize proteinase inhibitor	<i>S.littoralis</i>	Tamayo 2000
Potato multicystatin	<i>Diabrotica virgifera</i>	Orr 1994
	<i>D. undecimpunctata</i>	Orr 1994
Tomato protease inhibitor II	<i>Heliothis armigera</i>	Johnson 1989
Cowpea trypsin inhibitor	<i>Chilo suppressalis</i>	Xu 1996
	<i>C. inferens</i>	Xu 1996
	<i>Heliothis armigera</i>	Lawrence 2001
Squash trypsin inhibitor	<i>H. virescens</i>	MacIntosh 1990
Cabbage protease inhibitor	<i>Trichoplusia ni</i>	Broadway 1995
Soybean cysteine PI	<i>D.virgifera</i>	Zhao 1996
Soy cystatin	<i>C.maculatus</i>	Koiwa 1998
Oryzacystatin I	<i>Otiorynchus suculatus</i>	Michaud 1995
	<i>C.chinensis</i>	Abe 1992
	<i>T.castaneum</i>	Chen 1992
	<i>Leptinorsa decemlineata</i>	Michaud 1995
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Urwin 1995
	<i>Chrysomela tremula</i>	Leple 1995
	<i>Riptortus clavatus</i>	Abe 1992
	<i>D.undcimpunctata</i>	Edmonds 1996
	<i>Heterodera schachtii</i>	Urwin 1997
	<i>Anthinomous grandis</i>	Pannetier 1997
	<i>Meloidogyne incognita</i>	Vain 1998
Oryzacystatin II	<i>C.chinensis</i>	Abe 1992
	<i>R. clavatus</i>	
Wheat germ cysteine + Serine PI	<i>T.castaneum</i>	Oppert 1993

Taula 17: Inhibidors de proteases de plantes i la seva activitat contra plagues. S'inclouen estudis d'inhibició *in vitro*, assaigs d'incorporació d'IPs a la dieta i bioassaigs en planta. (Lawrence, 2002). Una informació més detallada sobre plantes modificades genèticament amb gens d'IPs es presenta en l'apartat 8.1.

5.2.1 Inhibidors de serinaproteases

Els inhibidors de serinaproteases són els IPs més abundants en plantes, i s'acumulen en els teixits de reserva (tubercle, llavor). La família dels inhibidors de serinaproteases s'ha subdividit en subfamílies en base a les dades de seqüència i estructura. Els IPs de serinaproteases més abundants són els inhibidors de tripsines i quimotripsines; molts d'ells, però, són bifuncionals i poden inhibir dues d'aquestes activitats. Els inhibidors d'elastasa són, amb diferència, els menys abundants i menys caracteritzats dels inhibidors de proteases de plantes.

Els aminoàcids P1 que determinen l'especificitat per cada una d'aquestes activitats inhibidores, es mostren a continuació:

Inhibidor	Residu P1 del centre reactiu
Inhibidor de tripsina	lisina, arginina
Inhibidor de quimotripsina	tirosina, fenilalanina, triptòfan, leucina, metionina
Inhibidor d'elastasa	alanina, serina

Dins una mateixa família d'inhibidors el residu P1 canvia freqüentment, donant com a resultat canvis en l'especificitat d'inhibició. Això implica una hipervariabilitat que permet la resposta de la planta front els diferents tipus de plagues, i/o patògens, que poden atacar-la al llarg de la vida.

L'inhibidor del blat de moro, MPI, objecte d'estudi d'aquest treball, pertany al grup dels inhibidors de serinaproteases, presentant una especificitat d'inhibició contra quimotripsines i elastases (Tamayo *et al.*, 2000). Gens que codifiquen per a inhibidors de serinaproteases han estat utilitzats fonamentalment per a la protecció de plantes front insectes lepidòpters (veure apartat 8.1).

5.2.2 Inhibidors de cisteïnoproteases

Els inhibidors de cisteïnoproteases actuen inhibint proteases de la superfamília de la papaïna, així com les catèpsines B, H i L (Koiwa *et al.*, 1997), impedit l'accés del substrat al centre catalític de la proteasa d'una manera indirecte (Bode & Huber, 2000). La majoria d'inhibidors de cisteïnoproteases actuen unint-se a punts superficials propers al centre actiu de la proteasa, impedit així l'accés del substrat al centre actiu, sense que es doni un bloqueig directe dels residus catalítics (Bode & Huber, 2000).

Els inhibidors de cisteïnoproteases més estudiats han sigut els identificats en d'arròs, anomenats *oryzacystatins* (OC-I i OC-II), dels que recentment se n'ha descrit l'estructura tridimensional mitjançant RMN (Abe *et al.*, 1987; Kondo *et al.*, 1991; Nagata *et al.*, 2000).

Els estudis realitzats amb plantes transgèniques per inhibidors de cisteïnoproteases, s'han centrat principalment en el seu efecte en insectes coleòpters. Aquests estudis han demostrat que els IPs de cisteïnoproteases afecten el desenvolupament de coleòpters, com per exemple *Diabrotica* en patata transgènica (Orr *et al.*, 1994), *Chrysomela* en àlber transgènic (Leple *et al.*, 1995) o *Anthonomus* en cotó transgènic (Pannetier *et al.*, 1997). Contràriament al resultat d'aquests estudis, altres assaigs han demostrat que la ingesta de *oryzacystatin* per part del coleòpter *Otiorynchus sulcatus*, condueix a la sobreproducció de

proteases insensibles a l'inhibidor, no veient-se afectat el desenvolupament del coleòpter (Michaud *et al.*, 1996).

5.2.3 Inhibidors de aspartilproteases

Els inhibidors d'aspartilproteases actuen inhibint activitats del tipus catepsina D, i també han estat descrits en diverses espècies de plantes, com per exemple en patata, tomàquet, veça (*Vicia sativa*) o card (Hannapel, 1993; Werner *et al.*, 1993; Herbers *et al.*, 1994; Strukelj *et al.*, 1995; Kreft *et al.*, 1997; Roszkowska-Jakimiec *et al.*, 1998; White *et al.*, 1999). En tubercles de patata s'ha aïllat un inhibidor de aspartilproteases, inusual per que també és capaç d'inhibir activitats tripsina i quimotripsina, a part de catepsina D (Mares *et al.*, 1989).

5.2.4 Inhibidors de metal·loproteases

Les plantes han desenvolupat com a mínim dues famílies d'inhibidors de metal·loproteases: la família de l'inhibidor de carboxipeptidases de patata (PCI) i la família de l'inhibidor de metal·loproteases de tomàquet (MCPI), (Rancour & Ryan, 1968; Graham & Ryan, 1981). Ambdós inhibidors són proteïnes petites, amb un pes molecular d'aproximadament 4KDa. Són estabilitzats per tres ponts de disulfur, i presenten gran estabilitat front desnaturalització o digestió per endoproteases (Villanueva *et al.*, 1998). L'inhibidor de patata PCI, s'acumula durant el desenvolupament del tubercle i també en fulla, en resposta a ferida (Graham *et al.*, 1997). Les activitats que inhibeixen els IPs de metal·loproteases són les corresponents a les carboxipeptidases A i B.

L'inhibidor PCI forma complexes amb carboxipeptidases A, inhibint-les fortament d'una manera competitiva (Vendrell *et al.*, 2000). El complex més caracteritzat és el del PCI amb la carboxipeptidasa A bovina (CPA) (Rees & Lipscomb, 1982; Molina *et al.*, 1994; Querol *et al.*, 1993).

Aquests inhibidors, aïllats en tomàquet i patata, inhibeixen fortament, i de manera competitiva, gran nombre de metal·loproteases d'animals i microorganismes, però no inhibeixen carboxipeptidases de llevats o plantes (Havkioja & Neuvonen, 1985).

5.3 Les proteases digestives d'insectes

Els insectes presenten en els seus sistemes digestius combinacions de diferents tipus de proteases amb diferents especificitats. Les proteases digestives catalitzen l'alliberament de pèptids i aminoàcids a partir de les proteïnes ingerides, i són molt abundants en la regió de l'intestí mitjà del tracte digestiu dels insectes. Aquestes proteases digestives s'han dividit en

endopeptidases, que trenquen les cadenes proteiques per llocs específics (inhibidors de serina-, cisteïna-, aspartil- i metal·loproteases), i les exopeptidases, que alliberen aminoàcids de les regions C- o N-terminal (carboxipeptidases i aminopeptidases) (Applebaum, 1985; Jongsma *et al.*, 1997).

Durant anys es va creure que els insectes només presentaven proteases del tipus serinaproteasa o aspartilproteases, degut a que la majoria dels estudis s'havien dut a terme amb lepidòpters i dípters, on aquestes dues classes de proteases hi són majoritàries (McFarlane, 1985). Actualment, s'ha demostrat que el sistema digestiu dels insectes es compon de diferents classes de proteases que inclouen, a part de les serinaproteases i les aspartilproteases, cisteïnproteases, metal·loproteases i exopeptidases (Wolfson & Murdock, 1990; Christeller *et al.*, 1992; Terra & Ferreira, 1994; Barret *et al.*, 1986).

Els diferents ordres dins dels insectes presenten uns perfils de proteases digestives característics i, generalment, existeix un tipus d'activitat proteàsica predominant i acompanyada d'una contribució menor dels altres tipus d'activitats digestives. Els lepidòpters, himenòpters, ortòpters i dípters utilitzen principalment serinaproteases en els seus sistemes digestius, mentre que els coleòpters i hemípters utilitzen majoritàriament cisteïnproteases (Ryan, 1990; Wolfson & Murdock, 1990; Murdock *et al.*, 1987). Aquestes combinacions de proteases poden, a més a més, variar amb la dieta i/o l'estadi larvari (Broadway, 1995; De Leo & Gallerani, 2002).

Les serinaproteases (tripsines, quimotripsines i elastases) han sigut detectades en el tracte digestiu d'insectes de moltes famílies diferents, essent molt abundants en els **lepidòpters**, on el pH de l'intestí és alcalí (pH 9-11). En el lepidòpters, les serinaproteases representen aproximadament el 80% de les activitats digestives, mentre que el 20% de l'activitat proteolítica digestiva restant correspondria a activitats tipus cisteïn-, aspartil- i metal·loproteasa, així com a exopeptidases. Una part important de les plagues de cultius agrícoles pertanyen al grup dels lepidòpters, d'aquí l'interès i aplicabilitat dels inhibidors de serinaproteases per a la millora de la resistència a plagues. Així, s'han realitzat nombrosos estudis tant d'inhibició del creixement mitjançant assaigs d'incorporació d'IPs a la dieta, com bioassaigs amb plantes transgèniques que expressen gens d'inhibidors de serinaproteases (Schuler *et al.*, 1998; Hilder & Boulter, 1999; Lawrence *et al.*, 2002) (veure a *Taula 17* i *Taula 32*, dels apartats 5.1 i 8.1 respectivament).

Estudis realitzats en intestins de diferents espècies de **coleòpters** han evidenciat que les cisteïnproteases solen ser el grup majoritari en el sistema digestiu d'aquests insectes, on el pH de l'intestí és àcid (pH 5-7), representant el 70-80% de les activitats digestives (Murdock *et al.*, 1987).

A part de les cisteïnproteases que hi són majoritàries, en espècies (de sis famílies) de l'ordre dels **hemípters** s'han descrit aspartilproteases del tipus catepsina D. Sembla que el

pH baix dels intestins dels membres d'aquest ordre són favorables per l'activitat de les aspartilproteases, de pH òptim 3-5 (Houseman & Downe, 1983).

En la *Figura 18* es representa la distribució dels diferents tipus de proteases digestives en insectes dels ordres dels lepidòpters i dels coleòpters.

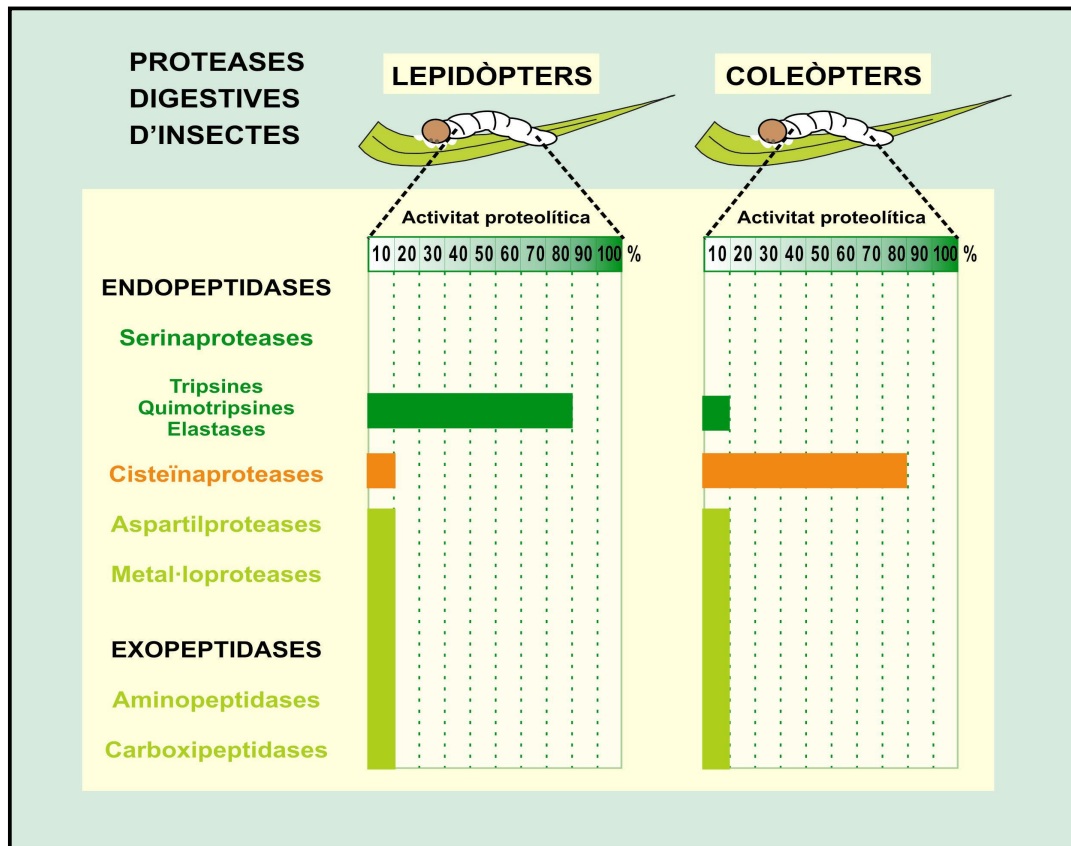


Figura 18: Proteases digestives d'insectes lepidòpters i coleòpters. S'indica el percentatge aproximat de la contribució, de diferents proteases, al conjunt de l'activitat proteolítica de l'intestí mitjà de l'insecte.

Per altra banda, els intestins dels insectes polífags presenten un espectre de proteases més ampli que els sistemes digestius d'insectes especialistes.

Malgrat que s'han detectat activitats dels diferents tipus de proteases en els intestins de gran varietat d'insectes, són poques les proteïnes caracteritzades des del punt de vista de la seva estructura o de les seves propietats enzimològiques.

En expressar, de manera constitutiva, gens que codifiquen per IPs en plantes, aquests són capaços de conferir protecció a la planta; protecció que assoleix diferents graus en relació amb el nivell d'expressió de l'IP assolit en planta (Jouanin *et al.*, 1998; Gatehouse & Gatehouse, 1998; Schuler *et al.*, 1998). Per altra banda, els insectes han desenvolupat diferents mecanismes per adaptar-se a la ingestió d'IPs (Jongsma *et al.*, 1995; Ishimoto &

Chrispeels, 1996; Michaud, 1997). Aquests mecanismes d'adaptació inclouen la síntesi de noves proteases digestives insensibles a l'IP ingerit, com és el cas en lepidòpters (Broadway, 1995; Jongsma *et al.*, 1995; Broadway *et al.*, 1996; Bown *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1997) i coleòpters (Bolter & Jongsma, 1995; Girard *et al.*, 1998b; Bonadé-Bottino *et al.*, 1999); o mitjançant la degradació de l'IP per part de proteases de l'insecte (Michaud *et al.*, 1995; Giri *et al.*, 1998; Girard *et al.*, 1998a).

Cal destacar que, l'especificitat de l'IP per una proteasa no es deu només als aminoàcids que ocupen els respectius centres reactiu i actiu, sinó que el reconeixement de l'IP i la proteasa, es basa també en els diferents aminoàcids que es troben situats al voltant del centre actiu, que determinaran la força de la unió (Laskowski, 1985). Així el nombre de subtipus de proteases dels que disposa l'insecte per a eludir l'acció de l'IP és força ampli, i explicaria la ràpida adaptació d'alguns insectes a la ingesta d'IPs de plantes, sobretot en el cas dels insectes polífags que han evolucionat per evitar l'efecte de gran varietat d'IPs defensius de plantes als que s'han vist confrontats.

Per poder dissenyar estratègies efectives per a la protecció front insectes-plaga de plantes transgèniques que expressin gens d'IPs, és de vital importància estudiar les característiques del sistema digestiu de l'insecte-problema, així com l'especificitat d'inhibició de l'IP per a les proteases de l'insecte. Així mateix combinacions de dos o més IPs expressats en una mateixa planta, o l'expressió d'inhibidors multifuncionals, dificultarien l'adquisició de resistència per part de l'insecte.

En aquest treball s'ha estudiat el sistema proteolític digestiu del lepidòpter *Chilo suppressalis*, plaga dels arrossars (pH òptim de les seves activitats proteolítiques digestives, proteases presents en el seu sistema digestiu). Així mateix s'ha estudiat la capacitat d'inhibició *in vitro* per part de l'inhibidor MPI de les activitats proteolítiques digestives de *Chilo*. Igualment, aquest estudi s'ha estès al lepidòpter *Cacyleus marshalli*, la plaga del gerani.

5.4 L'inhibidor de proteases de blat de moro, MPI

En el nostre laboratori es va identificar i caracteritzar el gen que codifica per un inhibidor de proteases de blat de moro (*Zea mays*): el gen *mpi* (maize proteinase inhibitor).

La seqüència d'aminoàcids deduïda del gen *mpi* presenta gran homologia amb els membres de la família de l'inhibidor I de patata (Cordero *et al.*, 1994). La família de l'inhibidor I de patata està formada per inhibidors de serinaproteases, i presenten generalment activitat inhibidora contra activitats del tipus quimotripsina; el residu P1 localitzat en el centre reactiu sol ser metionina o leucina (residus Met/Leu₄₇-Asp₄₈) (Norton, 1991). Contràriament, la seqüència d'aminoàcids deduïda del clon d'ADNc de l'MPI, mostra

la presència dels residus Ala-Asp (P_1-P_1') en les posicions corresponents del centre reactiu de la proteïna MPI. En la *Figura 19* es mostra la comparació de la seqüència aminoacídica de l'MPI amb les seqüències d'altres inhibidors de la família de l'Inhibidor I de patata.

En el nostre laboratori s'ha expressat el gen de l'inhibidor MPI en *Escherichia coli* mitjançant una fusió GST-MPI. La proteïna MPI recombinant, MPI(r), un cop purificada és funcional, i amb ella s'ha pogut dur a terme diferents assaigs d'inhibició de proteases *in vitro*. Així mateix, la proteïna MPI purificada s'ha utilitzat per a la producció d'anticossos anti-MPI en conills; els anticossos es varen preparar contra la proteïna MPI purificada (digestió de la proteïna fusió amb trombina → SDS-PAGE → recuperació de la proteïna MPI en gel → immunització) (Tamayo *et al.*, 2000; aquest treball). L'activitat inhibidora es realitza amb la proteïna fusió GST-MPI.

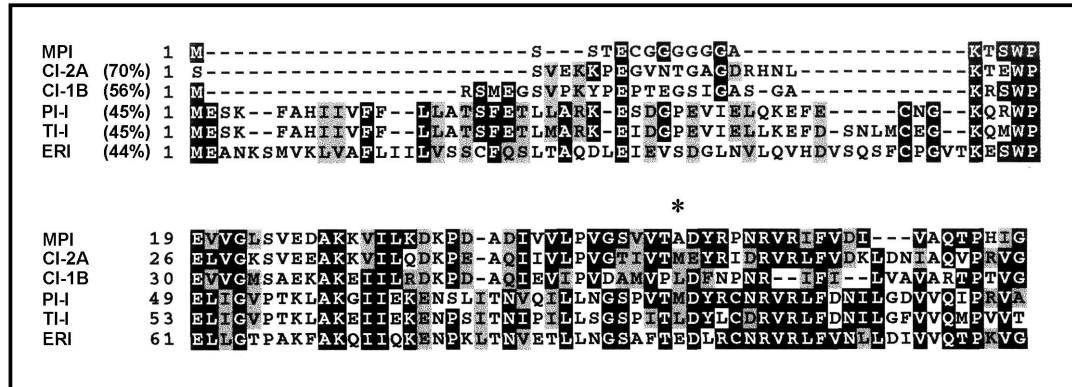


Figura 19: Alineació de la seqüència d'aminoàcids de l'inhibidor MPI, amb les seqüències d'altres inhibidors inclosos en la família de l'inhibidor I de patata. *CI-2A* i *CI-1B*, inhibidors de tripsina d'ordi; *PI-I*, inhibidor de patata I; *TI-I*, inhibidor de tomàquet I; *ERI*, *ethylene responsive protease inhibitor* de tssssgomàquet. Entre parèntesi, % d'identitat de la seqüència. L'asterisc indica la posició del centre reactiu (residu P_1). En negre i gris s'indiquen els aminoàcids idèntics o similars, respectivament. (Tamayo, 2000).

Els estudis d'inhibició *in vitro* amb l'inhibidor MPI, realitzats en el nostre laboratori, han permès determinar les propietats inhibidores d'aquest inhibidor sobre proteases de mamífers i insectes. Mentre que els inhibidors de la família de l'inhibidor I de patata, solen presentar una elevada activitat inhibidora front quimotripsines de mamífer, l'inhibidor MPI presenta una lleugera activitat inhibidora per aquestes quimotripsines, però en canvi una forta activitat contra elastases de mamífer. Aquesta activitat inhibidora de l'MPI front elastases és coherent pel fet que, el centre reactiu de l'MPI, presenta una alanina. Altres IPs de plantes amb activitat elastasa, com el VSI (Vicia subtilisin inhibitor; Svendsen, 1984) o C-II (Soybean inhibitor C-II; Odani & Ikenaka, 1977) també presenten una alanina en P_1 . En el cas del

CMTI III (*squash seeds trypsin inhibitor*), la substitució del P1 per una Ala incrementa l'activitat contra elastases (Rolka *et al.*, 1991).

Cal esmentar que l'estructura tridimensional de l'inhibidor CI-2 d'ordi ha estat resolta tant per cristal·lografia de raigs X (McPhalen & James, 1987) i per RMN (Kjær; 1987; Clore *et al.*, 1987). Bàsicament es tracta d'una estructura en forma de falca, i presenta el centre reactiu en seu extrem més estret. El cor hidrofòbic està format per l'empaquetament de 2 fulles- β oposades a una hèlix- α (veure *Figura 20*). L'inhibidor CI-2 presenta una metionina al centre reactiu P1 (Hasan & Leatherbarrow, 1998). Cal destacar que l'inhibidor MPI i el CI-2 presenten un 70% d'identitat que permet predir que, l'inhibidor MPI, tindrà una estructura tridimensional superposada a l'estructura de l'inhibidor d'ordi.

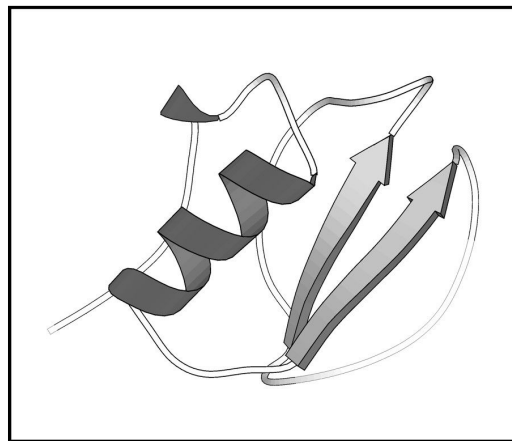


Figura 20: Estructura tridimensional de l'inhibidor de quimotripsina d'ordi CI-2 (PDBsum).

5.4.1 Activitat de la proteïna MPI front proteases digestives d'insectes

Amb la proteïna MPI expressada en *Escherichia coli*, també es dugueren a terme assaigs d'inhibició amb extractes d'intestins de larves de *Spodoptera littoralis*. Aquest lepidòpter (se l'anomena popularment *rosquilla negra*) és un insecte polífrag que ataca gran nombre de cultius, entre ells l'arròs, del qual en devora les fulles. Com en la majoria de lepidòpters, les serinaproteases són les activitats proteolítiques predominants en el seu sistema digestiu (Christeller *et al.*, 1992; Purcell *et al.*, 1992).

Mitjançant la utilització del substrat caseïna (substrat general de proteases) es determinà que el 40% de les activitats proteolítiques d'*Spodoptera* eren susceptibles d'inhibició per part de l'inhibidor MPI. En la *Figura 21* es mostra la inhibició de les activitats digestives de *S. littoralis* per part de l'inhibidor MPI.

Així mateix, en aquests assaigs s'utilitzaren també substrats específics per proteases del tipus quimotripsina (SA₂PPpNA i SA₂PLpNA) i elastasa (SA₃pNA). Es determinaren els valors IC₅₀ (concentració d'inhibidor necessària per a obtenir el 50% d'inhibició de l'activitat

proteolítica) pels substrats específics, que estaven en el rang de 0,2-0,7 μM (veure *Figura 21*).

Els estudis d'inhibició de les activitats proteolítiques de l'intestí de *S. littoralis* amb l'inhibidor MPI, han demostrant que l'MPI inhibeix de manera efectiva les activitats quimotripsina i elastasa de l'intestí de larves d'aquest lepidòpter (Tamayo *et al.*, 2000).

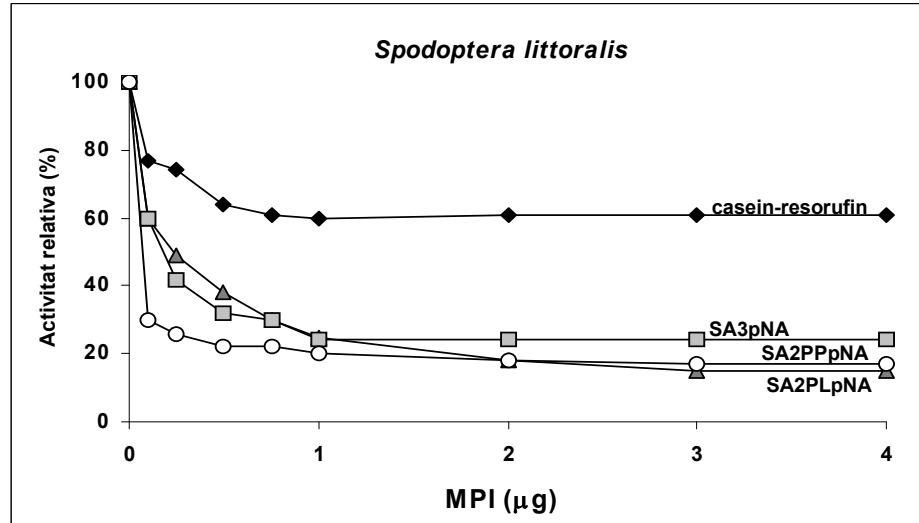


Figura 21: Inhibició de les activitats proteolítiques digestives de *Spodoptera littoralis* per l'inhibidor MPI. Els substrats utilitzats són caseina marcada amb resorufin (\blacklozenge); SA₃pNA, substrat per a activitats del tipus elastasa (\square); SA₂PPpNA (\bullet) i SA₂PLpNA (\blacktriangle), ambdós substrats per a activitats del tipus quimotripsina (Tamayo *et al.*, 2000).

Així doncs, la capacitat de l'inhibidor MPI d'inhibir dos tipus diferents de proteases digestives del lepidòpter *S. littoralis*, quimotripsina i elastasa (proteases que predominen en el sistema digestiu de lepidòpters) juntament amb el fet que és efectiu a concentracions baixes, feia del gen *mpi* un candidat adequat per a ser utilitzat, mitjançant transgènia, en la millora de la resistència de plantes contra insectes lepidòpters.

Amb aquests antecedents es va iniciar aquest treball dirigit a l'obtenció de plantes d'arròs transgèniques que expressin el gen *mpi*, amb l'objectiu concret de millorar les propietats de resistència de l'arròs front el lepidòpter *Chilo suppressalis*, la plaga més important dels arrossars mediterranis.

Així mateix, en el transcurs d'aquest estudi s'han obtingut resultats preliminars que han permès obrir una línia similar d'investigació en la direcció de la protecció front el lepidòpter *Cacyreus marshalli*, plaga del gerani.