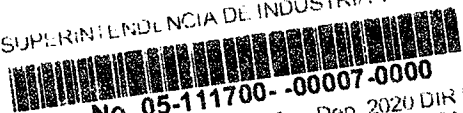


SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 62,274
 FECHA : AGOSTO 2 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 05-111700-00007-0000

Fecha: 2010-08-03 13:53:56 Dep: 2020 DIR NUEVASCO
 Tra: 11 PATENTE IYII Eje: 379 FASE NACIONAL II
 Act: 444 RESPUESTA REQUE Folios: 9

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	383932920	02/08/2010	6,593,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	
		12 MARCAS Y LENAS COMERCIALES	114,000.00
		TOTAL :	\$ 114,000.00

SDN: CIENTO CATORCE MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

REIVINDICACIONES MODIFICADAS OFICIO No.3980

①. Un método para producir una planta tolerante a condiciones de estrés que incluye los pasos de:

(a) proveer a las células de las plantas con un gen quimérico para crear células de plantas transgénicas, dicho gen quimérico comprende los siguientes fragmentos

- i) un promotor que puede ser expresado en plantas; *gral.*
- ii) una región ADN, la cual cuando es transcrita produce una molécula de RNA inhibitoria de ParG, dicha región de ADN comprende una secuencia de nucleótidos de por lo menos 21 a por lo menos 100 nucleótidos de una secuencia de nucleótidos que codifica un proteína que comprende la *revisar dif. seq.* secuencia de aminoácido SEQ ID No. 1, 2 o 16, o por lo menos 21 a por lo menos 100 nucleótidos de una secuencia de nucleótidos SEQ ID No. 3, 4, 15 o 23;
- iii) una región final 3' involucrada en la terminación de la transcripción y *gral.* poliadenilación;

(b) Regeneración de una población de las líneas de plantas transgénicas de dichas células de plantas transgénicas; y

(c) Identificación de una línea de plantas tolerantes al estrés dentro de dicha población de líneas de plantas transgénicas.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha molécula de RNA inhibitoria de ParG incluye una secuencia de nucleótidos de por lo menos 20 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos del gen ParG presente en dicha célula de la planta.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha molécula de RNA inhibitoria de ParG incluye una secuencia de nucleótidos de por lo menos 20 nucleótidos consecutivos del complemento de secuencia de nucleótidos del gen ParG presente en dicha célula de planta.

4. El Método de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en donde dicho gen quimérico además incluye una región de ADN que codifica un ribosoma auto-empalmante entre dicha región de ADN que *cuál seq?* codifica dicha molécula de RNA inhibitoria de ParG y dicha región final 3'.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho RNA inhibidor de ParG incluye una región de sentido que incluye una secuencia de por lo menos 20 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos del gen ParG presente en dicha célula de planta y una región antisentido que comprende una secuencia de nucleótidos de por lo menos 20 nucleótidos consecutivos del complemento de la secuencia de nucleótidos del gen ParG presente en dicha célula de planta, en donde dicha región de sentido y de antisentido son capaces de formar una región de RNA de doble ramificación que incluye por lo menos 20 nucleótidos consecutivos.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dichas condiciones de estrés son seleccionadas entre calor, sequía, agotamiento de nutrientes, estrés oxidativa o condiciones de luz alta.
7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además el cruce de dicha línea de planta transgénica con otra línea de planta para obtener la progenie de plantas tolerantes al estrés.
8. Una molécula de ADN que comprende
 - (i) Un promotor que puede ser expresado en plantas;
 - (ii) Una región ADN, la cual cuando es transcrita produce una molécula de RNA inhibitoria de ParG, dicha región de ADN comprende una secuencia de nucleótidos de por lo menos 21 a por lo menos 100 nucleótidos de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 1, 2 o 16 o por lo menos 21 a por lo menos 100 nucleótidos de una secuencia de nucleótidos SEQ ID No. 3, 4, 15 o 23;
 - (iii) una región final 3' involucrada en la terminación de la transcripción y poliadenilación;
9. Una célula de planta que incluye una molécula de ADN de la reivindicación 8.

The involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in the oxidative stress responses in plants

Yehudit Amor^a, Elena Babiychuk^b, Dirk Inzé^b, Alex Levine^{a,*}

^aDepartment of Plant Sciences, Institute of Life Sciences, The Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem 91904, Israel

^bLaboratory of Genetics, University of Ghent, K.L. Ledeganckstraat 35, 9000 Ghent, Belgium

Received 13 August 1998; received in revised form 21 October 1998

Abstract In plants many biotic and abiotic stresses can cause secondary oxidative stress. Earlier work showed that, depending on the severity of the oxidative stress, plants can activate either cell protective genes or programmed cell death (PCD). Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) has been implicated as one of the enzymes in the apoptotic pathways induced by DNA damaging agents or oxidative stress. We show that in cultured soybean cells, PARP is involved in responses to mild and severe oxidative stresses, by mediating DNA repair and PCD processes, respectively. Addition of PARP inhibitors reduced the degree of cell death triggered by H₂O₂. Two windows of NAD consumption after H₂O₂ treatment were detected. Experiments with transient overexpression of *Arabidopsis* PARP cDNA promoted DNA repair and inhibited cell death caused by mild oxidative stress. However, following severe stress PARP overexpression increased cell death. Expression of antisense PARP produced the opposite effects: an increase in DNA nicks and inhibition of cell death at high, but not mild doses of H₂O₂.

© 1998 Federation of European Biochemical Societies.

Key words: Poly(ADP-ribose) polymerase; Oxidative stress; Programmed cell death; Nicotinamide adenine dinucleotide; H₂O₂

1. Introduction

In natural environments plants are subjected to many environmental stresses which in turn can cause secondary oxidative stress [1]. In fact, in many cases the secondary oxidative stress is the major cause of the cellular damage during the altered environmental conditions. This is true for abiotic stresses such as cold stress [2,3], light stress [4], mechanical stress [5] and also for stresses caused by bacterial and fungal pathogens [6,7]. The excessive formation of reactive oxygen species (ROS) in response to the primary, environmental stress activates a signal transduction pathway that may be independent of or additive to the signals induced by the primary stress [8].

Oxidative burst constitutes one of the first plant responses to pathogen attack. We have shown previously that in soybean cells a high dose of H₂O₂ induces a programmed cell death (PCD) response [9]. In plants, PCD has been implicated in differentiation of tracheary elements, hypersensitive response to pathogens, normal root, leaf and embryo development [10]. A number of intrinsic (hormones, position) and extrinsic (pathogens, light) signals can initiate PCD, yet the

variety of morphological and biochemical profiles of PCD in plants is so broad that it is not clear whether a single or multiple programs execute plant PCD [10,11].

Several groups have shown that differentiation of tracheary elements could be prevented by 3-aminobenzamide, nicotinamide and 6(5*H*)-phenanthridinone, substances that are considered rather specific inhibitors of poly(ADP-ribosylation) [12-14]. Poly(ADP-ribosylation) is a unique post-translational modification of nuclear proteins, which is strongly stimulated in cells following environmental insults [15]. NAD⁺:protein-(ADP-ribosyl)transferase (polymerase) (ADPRT or PARP; EC 2.4.2.30) catalyzes poly(ADP-ribosylation) by covalent attachment of ADP-ribose from nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) to glutamic acid residues in protein, followed by further transfer of ADP-ribose units onto the initial adduct to form poly(ADP-ribose) [16,17]. Poly(ADP-ribosylation), as a type of secondary protein modification, is widely distributed among eukaryotes including animals, insects, fungi, plants, and dinoflagellates [18]. PARP is a nuclear protein with a bipartite nuclear localization signal [19] that is tightly bound to chromatin or nuclear matrix [18,20]. Low basal PARP activity is stimulated up to 100-fold following PARP binding to nicked DNA [21] and massive synthesis of poly(ADP-ribose) is part of the rapid stress response in mammalian cells toward generation of DNA strand interruptions by DNA damaging agents [15]. In vivo poly(ADP-ribose) is a short-lived polymer with a half-life of 1-2 min, being degraded by poly(ADP-ribose) glycohydrolase [15]. Although poly(ADP-ribosylation) of a number of nuclear proteins has been described [22-24], there is no evidence at present that poly(ADP-ribose) synthesis on nuclear proteins, other than PARP, is of any physiological significance [18]. Many studies on the functional role of PARP, among them using PARP inhibitors, have indicated that it is associated with DNA repair and DNA replication [20,25]. However, PARP-deficient mice seem healthy and fertile, and therefore it was suggested that PARP plays no essential role in cell proliferation, differentiation or development, but controversial results were reported for the capacity of DNA repair and sensitivity to DNA damage in transgenic animals [26,27].

One of the consequences of PARP activation is depletion of NAD. It was hypothesized that a cause and effect relationship exists between PARP activation, loss of NAD, and cell death induced by oxygen radicals [28,29]. Therefore, at least in some animal cell types PARP may play a role in control of cell death through NAD depletion. The association of PARP with PCD is supported by the discovery that PARP is one of the targets of ICE-related proteases [30,31]. The generation of a separate zinc finger domain during apoptosis may be equivalent to the in vivo expression of the dominant-negative amino-terminal fragment of PARP [32,33], and might be ex-

*Corresponding author. Fax: (972) (2) 658 4425.
E-mail: alexl@leonardo.ls.huji.ac.il

pected to enhance cell death in conjunction with DNA fragmentation.

The biology of PARP in plants is much less understood. Enzymatic activity was partially purified from maize seedlings [34,35]. The activity detected is most likely associated with the *zap* gene of maize PARP (E. Babiychuk and D. Inzé, unpublished results). The ZAP (EMBL accession number AJ222589) protein is highly similar to the animal PARP gene as regards domain organization. A different shorter type of PARP (72–73 kDa) was cloned earlier from *Arabidopsis thaliana*, called APP [36] and recently its homologue was cloned from *Zea mays*, and called NAP (EMBL accession number AJ222588). Thus, in maize plants there are two PARP genes. The APP/NAP proteins do not possess a classical DNA binding domain composed of zinc fingers, yet they are localized in the nucleus and their activity is inducible by binding to nicked DNA, and inhibited by nicotinamide and 3-aminobenzamide (Babiychuk et al., in preparation). It has been suggested that in plants PARP activity may also have a role in the regulation of a major branch in secondary metabolism, the activation of phenylalanine ammonia lyase (PAL) in response to severe oxidative stress [37].

In the present study we have analyzed the possible involvement of PARP proteins in plant PCD, using cultured soybean cells. In this system PCD can be induced directly, through application of an exogenous oxidative stress [9], in a manner recently reported for *Arabidopsis* cell cultures [38]. We show that in soybean cells PCD is preceded by a drop in cellular NAD levels, indicating the activation of PARP. The PCD induced by a high dose of H_2O_2 was inhibited by PARP inhibitors and by ectopic expression of the *app* gene in the antisense orientation as opposed to the sense orientation. On the other hand, overexpression of the *app* gene in the sense orientation improved the survival of soybean cells following mild oxidative stress. The transformation experiments also affected the number of DNA nicks. In summary, our data are in favor of an important role for poly(ADP-ribose)polymerase(s) in the regulation of cell protective and PCD responses in plants.

2. Materials and methods

2.1. Cell cultures

Soybean cells, cultivar William's 82, were maintained in 250 ml flasks in Murashige and Schoog medium (Sigma) at 25°C. Cultures were maintained by transferring 6 ml of a 2 week old culture into 40 ml fresh medium. Two day old cells were used for all experiments. Inhibitors were dissolved in sterile water and added to culture medium. Cell death was assayed as described in [9].

2.2. NAD measurements

Cells were harvested by vacuum filtration and immediately lysed in 200 μ l of 2% perchloric acid. Lysed cells were centrifuged at 20 000 $\times$ g for 20 min and the supernatants analyzed by a cycling enzymatic reaction which measures NAD content [39]. The concentration was determined by standard curve fitting with NAD (Sigma). To determine the dry weight of cells, the samples were dried overnight at 80°C.

2.3. Plasmid constructs

For expression of the *app* cDNA in plant cells, in either sense or antisense orientation, the full-length *app* cDNA was excised from a pC3 clone [36] as a *Xho*I-*Bam*HI fragment, blunted with Klenow polymerase (NEB) and ligated into the *Sal*I site of pGSCDH35 [40]. In two resulting plasmids pSPA9 and pSPA10, the *app* cDNA was placed under the control of the 35S CaMV promoter in antisense and sense orientations, respectively. To combine the *app* expression cas-

ettes with a cassette expressing the *Escherichia coli uidA* gene, to be used as gene-reported for data normalization, the bacterial GUS gene was inserted as a translational fusion with *app*. Finally, binary vectors were introduced into *Agrobacterium tumefaciens* by the freezing-thawing procedure.

2.4. Soybean cell transformation

Cells of recombinant *A. tumefaciens* were grown in LB for 40 h at 28.5°C. Prior to inoculation the bacteria were washed two times to remove the LB, resuspended in 10 mM $MgCl_2$ and added to 36 h old soybean cells at a concentration of 3×10^8 cells/ml. A second identical dose of agrobacteria was added to the suspension 24 h later. 48 h after the initial inoculation the agrobacteria were removed by extensive washing over Miracloth (CalBiochem) and cells were left quiet for 6 h prior to treatment with H_2O_2 . A sample of the cells transformed with GUS was fixed and stained with X-gluc.

2.5. Western analysis

Total protein extracts from soybean culture cells were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose (Millipore). The membrane was blocked for 30 min with 3% low fat milk in TBS and incubated overnight at 4°C in blocking solution containing anti-*Arabidopsis* APP at 1:1000 dilution. The anti-APP antibody was prepared in rabbits immunized with a bacterially produced carboxy-terminal part of the protein (Met³¹⁰-His⁶³⁷). The second antibody was goat anti-rabbit conjugated to horseradish peroxidase. The PARP protein was detected by the ECL method (New England Biolabs).

2.6. Nucleus preparation and nick translation

Cells from 5 ml cultures were harvested with vacuum and immediately frozen in liquid nitrogen. Nuclei were prepared by grinding the cells with a mortar and pestle in order to keep the nuclei intact, as described in [41]. The frozen powder was transferred to 1 ml of buffer A (20 mM Tris, 0.25 M sucrose, 10 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 150 μ M spermine and 0.5 mM spermidine), filtered through two layers of Miracloth (CalBiochem) and centrifuged for 30 s at 4°C, 1200 $\times$ g. The nuclear pellet was washed three times in buffer A and two more times in buffer B (20 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 15 μ M spermine and 50 μ M spermidine). Nuclei were resuspended in nick translation buffer (New England Biolabs) with 2.5 μ Ci of [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol, ICN) and 300 μ M of other dNTPs in 50 μ l reaction mixture. The reaction was initiated by addition of 1 unit of DNA polymerase (NEB, Klenow fragment). The reaction was stopped by adding 1 ml of cold 10% TCA incubated on ice for 5 min and centrifuged at 20 000 $\times$ g for 10 min. The pellet was washed three times with cold 10% TCA to remove unincorporated label. Samples were counted in a Beckman scintillation counter.

3. Results

3.1. Inhibition of soybean PCD by PARP inhibitors

Earlier studies have shown that in cultured soybean cells oxidative stress activates the PCD response, which resembles apoptosis in animals [8]. Most importantly, H_2O_2 induces DNA fragmentation, i.e. double stranded DNA breaks, which were shown to act as activators of the PARP enzyme in animal systems [16,18]. As a first step to test the involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in the PCD response we used two PARP inhibitors, 3-aminobenzamide (3-ABA) and nicotinamide [28,42]. Soybean cells were preincubated for 30 min with the inhibitors and then treated with 5 mM H_2O_2 , a concentration that induced PCD in about 50% of cells [9]. Both PARP inhibitors blocked cell death induced by the oxidative stress, suggesting that PARP activity may play an important role in soybean PCD (Fig. 1A). The degree of protection depended on the dose of the inhibitor, in agreement with the competitive mode of action of these inhibitors, although additional factors cannot be excluded. The reduction in cell death by the inhibitors also indicates that the given concentration of H_2O_2 was not toxic on its own. These results were

Characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA homologue to animal poly(ADP-ribose) polymerase

Loïc Lepiniec^a, Elena Babiychuk^b, Sergei Kushnir^b, Marc Van Montagu^{b,*}, Dirk Inzé^a

^aLaboratoire Associé de l'Institut National de la Recherche Agronomique (France), B-9000 Gent, Belgium

^bLaboratorium voor Genetica, Universiteit Gent, K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gent, Belgium

Received 15 March 1995

Abstract A full-length *Arabidopsis thaliana* cDNA (*app*) encoding a protein with high similarity (about 60%) to the catalytic domain of vertebrate poly(ADP-ribose) polymerase (PARP; EC 2.4.2.30) has been cloned. The N-terminal extension of the *Arabidopsis* protein shows similarities with domains of different nuclear and DNA binding proteins in agreement with nuclear localization and putative function of a plant PARP. APP is encoded by a single gene mapped at the top of chromosome 4 of the *Arabidopsis* genome and mRNA is abundant in cell suspension culture compared to its accumulation in whole plant.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; Evolution; Poly(ADP-ribose) polymerase

1. Introduction

Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP; EC 2.4.2.30) is generally described as a nuclear enzyme found in most eukaryotes, including vertebrates, arthropods, molluscs, slime moulds, dinoflagellates, fungi and other lower eukaryotes with the exception of yeast, and corresponding cDNAs have been isolated from several species of mammals, chicken, *Xenopus*, and insects (for review, see [1–3] and Fig. 5). Structure–function studies have shown that animal PARPs may be divided into at least three subdomains [4]. The N-terminal part (46 kDa) contains two zinc fingers and has a high affinity for nicked, V-shaped DNA. Interaction of PARP with nicked DNA strongly enhances the activity of the catalytic domain (54 kDa), which is very well conserved among all PARPs and located in the carboxyl-terminus of the protein. Automodification of the central domain (22 kDa) apparently serves as negative feedback regulation of the PARP.

PARP catalyses both the transfer of ADP-ribose from NAD⁺, mainly to the carboxyl group of a glutamic acid residue on target proteins, and subsequent ADP-ribose polymerization (for review, see [4–7]). PARP itself, histones, high mobility group chromosomal proteins, a topoisomerase, endonucleases

and DNA polymerases have been shown to be modified by PARP (for a review see [7]). The high negative charge of poly(ADP-ribosyl) chains attached to the protein decreases its affinity for DNA. These observations are in agreement with association of the PARP with chromatin and its involvement in DNA repair, replication and recombination and in cell division and differentiation [7–12]. PARP exerts other complex effects on cell metabolism due to the depletion of cellular NAD⁺ [13]. Lastly, it has been suggested that nicotinamide resulting from NAD⁺ hydrolysis by PARP, may be one of the early stress response signal in eukaryotes, including plants [14].

The first evidence of plant poly-ADP-ribosylation was obtained from investigations on germinating seeds, and cytological work with onion tissues. PARP activity has been further demonstrated in isolated nuclei from cultured tobacco cells, wheat, and pea [14–18]. Plant PARP is mostly associated with chromatin [19] and may have a similar role in DNA repair as in mammalian cells [20].

Here we report the cloning and characterization of the first plant cDNA encoding a PARP homologue. Its structure and expression are studied and compared to those of animal PARP. Finally, the putative function of PARP in plants is discussed.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Arabidopsis thaliana ecotypes Landsberg erecta and Columbia were grown in soil under 16-h light conditions at 22°C. The cell suspension culture was grown in a liquid MS medium supplemented with 1 mg/l of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on a gyratory shaker at 80 rpm.

2.2. Isolation of PARP cDNA

Several cDNAs of *A. thaliana* have been isolated during a specific screening in yeast cells (data in preparation). Among them, the clone yb55 (1720 bp) encodes a protein showing a high similarity with the catalytic domain of animal PARPs (Fig. 1). The cloned fragment was used to screen 10⁶ recombinant phages of an *Arabidopsis* cDNA library made from cell suspension culture mRNA in λZAP vector [21]. Nine positive clones were purified, and cDNA containing pBluescript SK phagemids were excised in vivo from the λ vector using the helper phage VSC-M13 (Stratagene, La Jolla, CA, USA). The sequences of the longest cDNA inserts were determined on both strands by the dideoxy nucleotide chain termination method according to the T7 sequencing kit (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Amplification of the 5' end of the mRNA has been done by the anchored-PCR approach as described by Trout et al. [22]. The cDNA template was synthesized on 5 µg of total leaf RNA using the preamplification kit (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD, USA). The sequence of the gene specific oligonucleotide was 5'-CTGATCTAGCACCCTGACCC-3' (nucleotide numbers 574–553) and the sequences of the anchored primer and the primer complementary to it were described by Trout et al. [22].

2.3. DNA and RNA blot hybridization analyses

Total *Arabidopsis* DNA and RNA were extracted as described by Shirzadegan et al. [23]. DNA and RNA gel blot analyses and construc-

*Corresponding author. Fax: (32) (9) 264 5943.
BITNET: mamon@gengenp.rug.ac.be

The nucleotide sequence reported in this paper has been deposited in the EMBL database with Accession Number Z48243.

Abbreviations: APP, *Arabidopsis thaliana* homologue of PARP; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; PARP, poly(ADP-ribose) polymerase; PCR, polymerase chain reaction; 5' RACE, rapid amplification of 5' cDNA ends; RFLP, restriction fragment length polymorphism; SDS, sodium dodecyl sulfate

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) mapping analyses have been performed on 99 recombinant inbred (RI) lines provided by C. Lister and C. Dean (John Innes Institute, Norwich, UK; [26]). The marker generated by *DraI* restriction was used for the mapping of the *Arabidopsis* chromosome. Computing of the hybridization patterns was carried out by C. Lister (Norwich). Mapping data are available via AATdB.

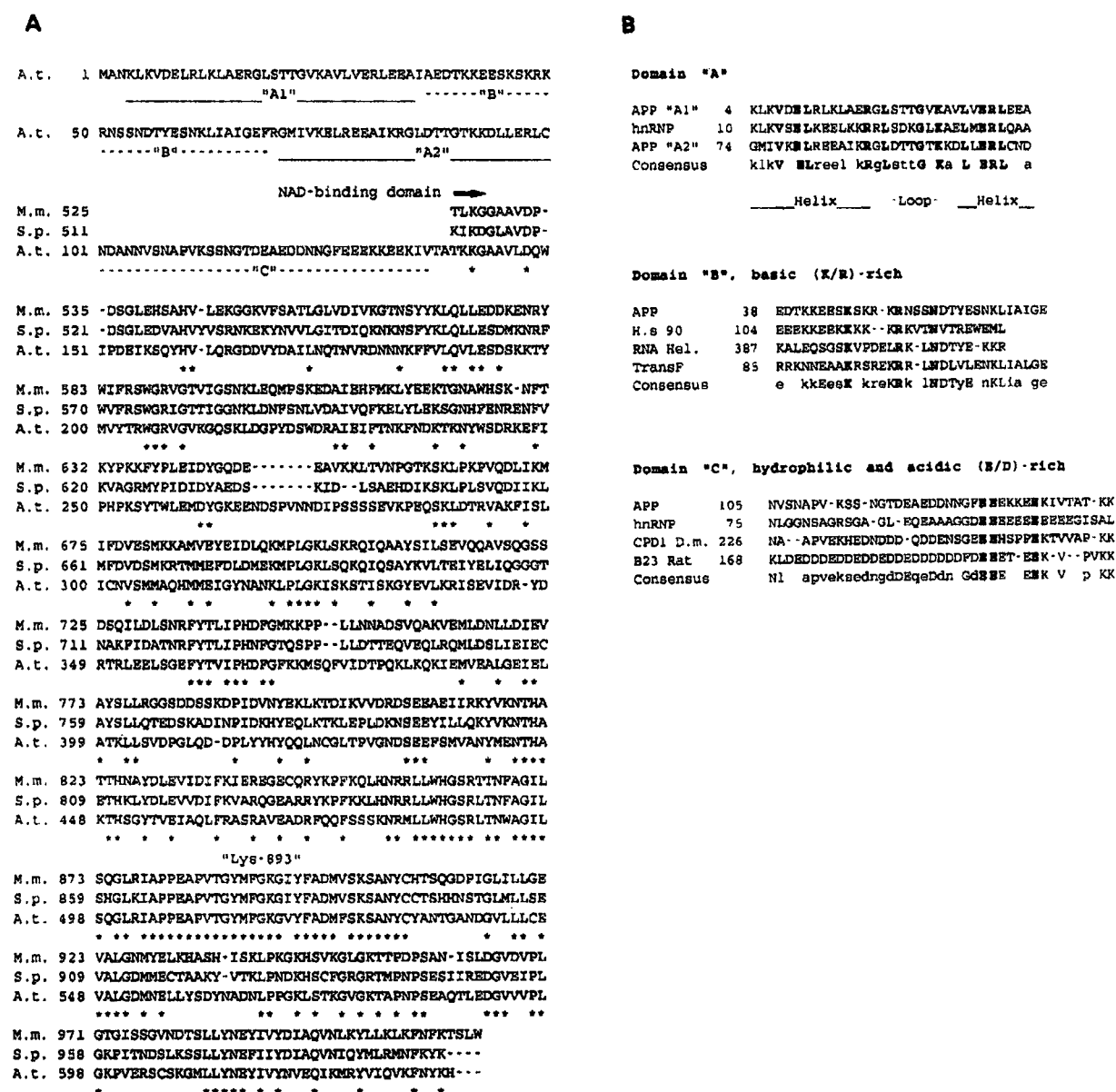


Fig. 1. Deduced amino acid sequence of the *Arabidopsis* app cDNA. (A) The amino acid sequence of the open reading frame encoded by the longest cDNA is presented (A.t. is *Arabidopsis thaliana*). Comparison with mouse (M.m.) and *Sarcophaga peregrina* (S.p.) PARP is shown from the beginning of the catalytic (NAD binding) domain indicated by an arrow. The accession number of the protein sequences in databases are P09874 (mouse), D16482 (*S. peregrina*) and Z48243 (*Arabidopsis*). Gaps introduced to obtain maximal homology are indicated by horizontal lines. The Lys-893 that has been shown to be involved in the active site is indicated above the sequences. The repeated sequences (A1 and A2), basic region (B) and putative automodification domain (C) as described in the text are underlined. (B) Similarity of the N-terminus of *Arabidopsis* APP with different nuclear proteins: a heterogenous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP, S22765) from human, a RNA helicase from *Dictyostelium* (RNA Hel., X81823), a human transcription factor (TransF, X63418), a nuclear heat-shock protein (HSP90, P24724), a chromosomal protein from *Drosophila* (CDP1, P22058) and a rat nuclear phosphoprotein (B23, P13084). Capitals indicate amino acids conserved in all sequences but one and bold capitals conserved in all sequences aligned.

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES**

Abogado
Luis Patiño Leyva

ASUNTO	Radicación	05-111700
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio	E 1 5 3 3 0
	Folios	005

Patente de Invención	☒	Patente de Modelo de Utilidad	☐
Vía Nacional	☐		
Vía PCT (fase nacional)	☒	Cap. I	☐ Cap. II ☒
No. Sol. Internacional	PCT/EP2004/003995		
Publicación Internacional	WO 2004/090140		21/10/2004

Como resultado del examen de fondo, realizado con fundamento en el artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica:

1. Documentos estudiados

<u>Descripción:</u>	Folios: 42 a 99 como se radicó inicialmente.	
<u>Reivindicaciones:</u>	Folios: 100 a 105 como se radicó inicialmente. Folios: 226 a 227 modificadas el 03/08/2010	
<u>Figuras:</u>	Folios: 107 a 141 como se radicó inicialmente.	
<u>Prioridad:</u>	09/04/2003 21/08/2003	EP 03076044.1 US 60/496.688

2. Objeto de la invención

Título de la solicitud: "Métodos y medios para incrementar la tolerancia de las plantas a condiciones de estrés".

El objeto de la presente solicitud de patente de invención consiste en obtener un método para incrementar la tolerancia de las plantas a condiciones adversas abióticas, usando la poli (ADP-ribosa).

El problema planteado en esta solicitud es disminuir el daño generado por el estrés abiótico, incluido el daño en el DNA de las células expuestas a condiciones adversas.

Para solucionar este problema técnico la solicitud en estudio proporciona un método para inhibir el daño en el DNA y en las células en general, a partir de la reducción de la expresión de ParG, resultando en una tolerancia incrementada al stress hídrico en las plantas.

IPC: C12N 15/82.

3. De la solicitud de Patente (según el caso)

3.1. Descripción (artículo 28 D. 486)

En general, el capítulo descriptivo no presenta una información suficiente para que el técnico versado en la materia pueda entender y desarrollar la invención puesto que no se evidencia que la invención si soluciona el problema técnico planteado.

- Aunque la solicitud menciona que el propósito del gen quimérico ParG es incrementar la tolerancia de las plantas al estrés, ni siquiera los ejemplos demuestran que el constructo planteado si logra este efecto. El ejemplo 5 que realiza la transformación de líneas de Arabidopsis y Nicotina, presenta resultados incompletos puesto que no se menciona cual es la diferencia entre las líneas transgénicas y porque se presenta la alta variabilidad entre los resultados encontrados en los valores de contenido de NAD+NADH (ver tablas 1 y 2).
- Los ejemplos 6 y 7 tampoco presenta resultados sobre el contenido de NAD y ATP en plantas de arroz y maíz, transformadas. Esto deja sin soporte el resultado de la invención sobre la tolerancia al estrés en plantas heterólogas a partir de eventos de transformación con gen quimérico ParG.
- Por otra parte, aunque la solicitud plantea que los constructos sentido y antisentido de ParG pueden ser usados en diferentes especies de plantas, distintas de especie de la cual se tomó la secuencia para el constructo, a lo largo de la descripción no se evidencia los resultados obtenidos en este aspecto. Solo el ejemplo 5, tabla 2 muestra resultados de este tipo, pero tales resultados son positivos y significantes solo para una línea transgénica, lo cual no permite llegar a una conclusión de la efectividad de la transformación sobre la tolerancia al estrés para todas las especies vegetales.

De esta manera, la descripción presentada no cumple con los requisitos establecidos en el art. 28 de la Decisión 486.

3.2. Reivindicaciones (artículo 30 D 486)

El capítulo reivindicatorio presentado carece de concisión y claridad por cuánto:

- 1) Hay inconsistencia entre el capítulo reivindicatorio y el descriptivo, puesto que las reivindicaciones están dirigidas a métodos para producir una tolerancia de la planta a las condiciones de estrés donde estas plantas pueden ser cualquier especie del reino vegetal. Sin embargo, tal generalización carece de sustento puesto que en el capítulo descriptivo no hay resultados que muestren la efectividad del método aplicado en especies heterólogas de manera tan amplia.

- 2) La reivindicación 4 menciona que el gen quimérico además incluye una región de ADN que codifica un ribosoma auto-empalmante entre dicha región de DNA que codifica dicha molécula de RNA inhibitoria de ParG y dicha región final 3', esta región debe ser definida de manera clara indicando la secuencia de la misma (el N° de la SEQ).

De esta manera, el capítulo reivindicatorio presentado no cumple con los requisitos establecidos en el art. 30 de la Decisión 486.

4. Excepción a la patentabilidad (artículo 20 D486 literal a)-d))

Teniendo en cuenta que las plantas, los animales y los **procesos esencialmente biológicos** para la producción de plantas o animales que no sean procedimientos no biológicos o microbiológicos, no se consideran patentables, la reivindicación 7, no podrá ser patentada.

De esta manera y de acuerdo a lo establecido en el artículo 20 de la Decisión 486 el contenido de la citada reivindicación deberá excluirse.

5. Determinación del Estado de la Técnica

La fecha que se ha tenido en cuenta para determinar el Estado de la Técnica es:
Fecha de presentación de la solicitud prioritaria 09/04/2003

Teniendo en cuenta la fecha indicada se realizó la búsqueda en el estado de la técnica de documentos relacionados con la solicitud encontrándose los siguientes documentos más relevantes:

N°	Documento	Título	Fecha de publicación
D1	Panda S., <i>et al.</i> Developmental Cell, Vol. 3, 51-61, July, 2002.	" <i>tej</i> Defines a Role for Poly(ADP-Ribosyl)ation in Establishing Period Length of the <i>Arabidopsis</i> Circadian Oscillator"	Jul, 2002
D2	US 2002/0040490	"Expressed sequences of <i>Arabidopsis thaliana</i> "	Abr, 2002
D3	Amor Y, <i>et al.</i> FEBS Letters, vol 440 (1998): 1-7	"The involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in the oxidative stress responses in plants"	1998

Resumen de los documentos citados:

D1: En un screen genético para periodo circadiano de longitud alterada en *Arabidopsis*, se aisló la mutación *tej* la cual actúa independientemente de la calidad y cantidad de luz. Este afecta la transcripción de genes controlada por reloj en *Arabidopsis* y afecta el tiempo de transición fotoperiodo-dependiente de crecimiento vegetativo a florecimiento.

D2: Se proveen composiciones de nucleótidos aislados y secuencias para genes de *Arabidopsis thaliana*. Se identifican homólogo o genes relacionados de las secuencias nucleótidas suministradas y se modulan la expresión o función de su proteína codificada.

D3: Según la severidad del estrés oxidativo, las plantas pueden activar tanto genes de protección de la célula o de muerte celular programada (PCD). La poli-(ADP-

ribosa) polimerasa (PARP) ha sido implicada como una de las enzimas en la ruta de la apoptosis inducida por agentes que dañan el ADN o inducida por estrés oxidativo.

6. Análisis de patentabilidad (artículo 14 D486)

6.1. Novedad (artículo 16 D486)

La solicitud en estudio trata de un método para producir una planta tolerante a condiciones de estrés que incluye los pasos de proveer a las células de las plantas con un gen quimérico, regenerar una población de líneas de plantas transgénicas, identificar una línea de plantas tolerantes al estrés. Los pasos detallados de este método se mencionan en la tabla 1.

El documento de Amor Y, et.al. (D3) divulga la actividad del gen de la poli-(ADN-ribosa) polimerasa en la activación de la apoptosis cuando hay estrés oxidativo, entre otros. Este documento prueba la actividad de esta enzima, transformando células de soya con un gen quimérico de PARP, específicamente utilizando un cDNA del gen PARP para hacer RNA de interferencia sentido y antisentido (ver resumen). Con lo anterior logran disminuir la expresión del gen PARP en las células transformadas y correlacionarlo con su tolerancia al estrés oxidativo al modificar la activación de la ruta apoptótica.

Las características esenciales compartidas entre la solicitud y el documento D3 son evidentes en la tabla 1, donde se aprecia que el método probado, la molécula de DNA con que se aplica y el objeto del mismo para establecer la tolerancia al estrés en plantas es igual entre los dos documentos.

Tabla 1. Comparación de características esenciales del método para producir plantas tolerantes a condiciones de estrés de la solicitud y el documento D3 (Amor Y, et.al, 1998).

Solicitud en estudio (RV 1 y 8)	D3
Método para producir una planta tolerante a condiciones de estrés, que incluye: a) proveer a las células de las plantas con un gen quimérico, que comprende los siguientes fragmentos: - un promotor que puede ser expresado en plantas; - región DNA de 21 a 100 nucleótidos que codifica proteína SEQ N° 1, 2 ó 16, ó por lo menos 21 a 100 nucleótidos de la SEQ nucleótidos N° 3, 4, 15 ó 23; - región 3' de terminación de transcripción y poliadenilación	Experimentos para conocer actividad PARP en muerte celular inducida por estrés oxidativo: Transformar células de soya con un fragmento que contiene los siguientes fragmentos (pág 2, materiales y métodos): - promotor control que se expresa en plantas: 35S CaMV (pág 2 columna izq, último párrafo) - segmento sentido y antisentido de cDNA de <i>app</i> que proviene clon pC3 (pág 2 columna izq, último párrafo) - gen bacterial GUS como fusión traduccional de <i>app</i> (pag 2 columna der, 1er párrafo)
b) regeneración de una población de líneas de plantas transgénicas, y	Cultivo de células de soya transformadas (pag 2 columna der, 2 párrafo)
c) identificación de una línea de plantas tolerantes al estrés	Identificación de células transformadas usando fijación y tinción con X-gluc (pag 2 columna der, 2 párrafo)

Debe resaltarse que tanto la solicitud como D3 utilizan el promotor el virus del mosaico del coliflor, conocido como CaMV 35S (ver folio 80 de la solicitud y pág 2 columna izq, último párrafo de D3)

También debe resaltarse que el documento D3 tiene como objeto probar la actividad del gen PARP dentro de la ruta de apoptosis celular inducida por estrés oxidativo, es

decir relacionan la actividad del gen PARP y el control del mismo con la sobrevivencia de las plantas.

Por tanto, las células transformadas con ParG, inclusive células heterólogas, así como su método de producción, ya eran conocidas en el estado del arte por el documento D3 y por tanto, afecta la novedad de las reivindicaciones 1-9 de la solicitud, haciendo que esta incumpla el artículo 16 de la D486.

6.2. Nivel inventivo (artículo 18 D486)

La solicitud en estudio trata sobre una tolerancia de la planta a las condiciones de estrés, donde estas condiciones son preferentemente la sequía y las altas temperaturas. La tolerancia se logra a partir de la alteración de la expresión del gen ParG, el cual transcribe la proteína poly ADP-ribosa deshidrogenasa. Se plantean varios métodos con los cuales se puede hacer la alteración de la expresión de ParG a partir de la inhibición del RNA, usando co-supresión ó RNA anti sentido, mencionado en las reivindicaciones 1-9

El documento D1, había divulgado la relación del gen ParG, específicamente de la Poly ADP-ribosilación con la alteración del funcionamiento horario o reloj de transcripción de la planta, es decir que de este documento ya se sabía que la alteración de ParG producía la alteración del ciclo circadiano en *Arabidopsis thaliana*. Con esta función también se divulgaba la relación de este gen con la estructura y rol en la tolerancia al estrés.

La diferencia entre D1 y la solicitud en estudio, es el método con el cual se logra la alteración o inhibición del gen ParG en la planta, puesto que en D1 se hace mediante mutagénesis, mientras que la solicitud además plantea hacerlo por métodos de RNA de interferencia.

Sin embargo, tales métodos muy conocidos en el campo técnico de la ingeniería genética, ya habían sido utilizados con el mismo propósito en el documento US 2002/0040490, el cual específicamente divulga la secuencia del ParG de *Arabidopsis thaliana*, en la secuencia N° 550 (con 100% identidad con la SEQ N°15 de la solicitud y 99.9% identidad con la SEQ N° 3 de la solicitud), la cual es inhibida por RNA anti-sentido, co-supresión, dsRNAi (pag 34, líneas 23-29).

Como se observa, a partir de la información divulgada en D1 y D2, un técnico versado en la materia conocía la función y tolerancia al estrés lograda por la alteración del gen ParG, así como los métodos con los cuales podría lograr tal inhibición. Así podría desarrollar la invención de la solicitud tal como esta planteada en la misma.

De esta manera, el desarrollo reclamado se deriva evidentemente del estado de la técnica y por lo tanto carece de actividad inventiva.

7. Conclusión:

Los requisitos de patentabilidad de la presente solicitud se encuentran afectados así:

N°	Documento N°	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	Panda S., <i>et.al.</i> Developmental Cell, Vol. 3, 51-61, July, 2002.	1-9	Nivel inventivo
D2	US 2002/0040490	1-9	Nivel inventivo
D3	Amor Y, <i>et.al.</i> FEBS Letters, vol 440 (1998): 1-7	1-9	Novedad

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de 60 días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.



ALIX CÉSPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (C)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha
26 NOV 2010

CONCEPTO TÉCNICO No. 3720	EXAMINADOR TÉCNICO Código No.202052
-------------------------------------	---