

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 242142 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **436296**

(22) Data zgłoszenia: **2020.12.09**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.06.13 BUP 24/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.01.23 WUP 04/2023**

(51) MKP:

C12N 15/82 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

UNIwersytet Jagielloński, Kraków, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

SHAYAN SARKAR, Kraków, PL

KENJI YAMADA, Kraków, PL

NATALIA STEFANIK, Strzyżów, PL

IKUKO HARA-NISHIMURA, Kitashirakawa, JP

TADASHI KUNIEDA, Nara, JP

(74) Pełnomocnik:

Rafał Witek, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Promotor aktywowany przez białko NAI1 oraz zawierający go układ ekspresyjny

PL 242142 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest promotor aktywowany przez białko NAI1 oraz zawierający go układ ekspresyjny, które mogą znaleźć zastosowanie w biotechnologii roślin.

Rośliny uprawne były selekcjonowane ze względu na wielkość otrzymywanych plonów oraz walory smakowe. Z tego powodu wykazują niższą odporność na choroby oraz na szkodniki niż dzikie rośliny. Kontrola szkodników roślin jest kluczowa w utrzymaniu wystarczającej produkcji żywności. Dlatego niezbędne jest ciągle poszerzenie dostępnych metod ochrony roślin.

Rośliny z rodziny Kapustowatych (*Brassicaceae*), takie jak *Arabidopsis thaliana*, wytwarzają organelle zwane ciałkami ER, pochodzące z retikulum endoplazmatycznego (ER) [1-3]. Ciałka ER, wyspecjalizowane są w akumulacji β -glukozydazy (BGLU), które posiadają sygnał retencji ER [4]. W *Arabidopsis* korzenie i komórki skórki siewek konstytutywnie gromadzą dużą liczbę ciał ER [2]. Olbrzymie komórki skórki liści również gromadzą konstytutywnie ciałka ER [5, 6], ale zranienie lub obecność hormonu zranienia – kwasu jasmonowego, dodatkowo indukuje akumulację ciał ER w całych liściach [7, 8]. Niedawno wykazano, że ciałka ER w siewkach i liściach są odpowiedzialne za obronę chemiczną przed zwierzętami roślinożernymi we współpracy ze glukozydami specyficznymi dla *Brassicaceae*, zwanymi glukozyzolanami [6, 9]. W ciałach ER, BGLU hydrolizują glukozyzolany, tworząc silną substancję odstraszącą szkodniki, system obrony zwany „bomba oleju musztardowego” [10-12].

Komórki mirozynazowe i ciałka ER są rozmieszczone tylko w niektórych gatunkach *Brassicales*, podobnie jak glukozyzolany, co sugeruje, że ewoluowały jako system obronny oparty na bombie gorczycowej. W uprawach rolniczych wykorzystywanych jest wiele roślin z rodziny kapustowatych (*Brassicaceae*). Zrozumienie działania systemów obronnych na poziomie molekularnym przyczyni się do poszerzenia wiedzy na temat systemów obronnych u roślin.

Czynnik transkrypcyjny NAI1 z *Arabidopsis thaliana* zaangażowany jest w formowanie ciałek ER dla zapewnienia ochrony przed zwierzętami roślinożernymi. Jednak motyw rozpoznający DNA dla NAI1 pozostawał nieznanym.

Celem wynalazku jest dostarczenie nowych narzędzi, które mogą być wykorzystywane w biotechnologii roślin.

Określony problem został rozwiązany w niniejszym wynalazku.

Przedmiotem wynalazku jest promotor aktywowany przez białko NAI1 oraz zawierający go układ ekspresyjny zdefiniowane w załączonym wniosku.

Wynalazcy określili motyw rozpoznawania DNA dla NAI1, co otwiera możliwość wykorzystania tego białka do indukcji określonych genów o unikalnych sekwencjach DNA. Przedmiotowy wynalazek może być bardzo przydatny dla przemysłu rolniczego, zwiększając „zestaw narzędzi” do produkcji roślin odpornych na szkodniki.

Określono aktywność wiązania DNA NAI1 *in vitro* i *in vivo*. Jak ustalono w wynalazku, białko NAI1 może wiązać się z fragmentem DNA o określonej sekwencji. Ponadto opracowano sztuczny system do indukowania genów przez NAI1 w liściach tytoniu.

Zastosowanie NAI1 pozwala na aktywację zestawu genów, które mają sekwencję wiążącą NAI1 w swoim promotorze. W roślinach z rodziny kapustowatych indukowane są geny związane z ciałkami ER, więc możemy użyć NAI1 do indukowania ciałka ER w celu wyjątkowego wzmocnienia systemu obronnego rośliny.

Można również wprowadzić sztuczne geny z sekwencją wiążącą NAI1, aby indukować te geny. Ze względu na niewielką liczbę systemów indukcji genów, unikalny system z wykorzystaniem NAI1 istotnie urozmaica ten zbiór.

Niniejszy opis został dodatkowo objaśniony na załączonych figurach.

Figura 1. Aktywność wiązania DNA przez białko NAI1. (A) Obraz żelu wybarwionego za pomocą Coomassie Brilliant Blue oczyszczonej tioredoksyny (TRX) i rekombinowanego białka fuzyjnego TRX-NAI1 (grot strzałki). (B) Diagramy ułożenia sekwencji G-box i E-box w promotorach NAI2 i BGLU23. Liczby wskazują pary zasad nukleotydów od kodonu początkowego (ATG). (C) EMSA wykazująca wiązanie NAI1 z sondą pNAI2 w sposób zależny od G-box. (D) EMSA NAI1 i sonda pNAI2 z różnymi konkurencyjnymi fragmentami DNA, zgodnie z oznaczeniem.

Figura 2. Lokalizacja NAI1 w komórkach roślinnych. Obraz z konfokalnego laserowego mikroskopu skaningowego (GFP) i obraz w jasnym polu siedmiodniowych siewek roślin transgeniczných *Arabidopsis* (A) i liści *N. benthamiana*, które są infiltrowane przez *Agrobacterium* zawierającymi odpowiednie konstrukty (B). Słupki skali – 50 μ m.

Figura 3. Model funkcji białka NAI1. Promotor NAI1 kieruje ekspresją NAI1 w siewkach i korzeniach *Arabidopsis*. Białka NAI1 wiążą się z kanonicznymi (G1) i niekanonicznymi (G2) sekwencjami G-box w promotorze NAI2, aby aktywować gen NAI2.

Figura 4. Aktywność czynnika transkrypcyjnego NAI1. (A) Schematyczny model konstruktu DNA zastosowany w eksperymencie. (B) Obrazy barwienia GUS w liściach *N. benthamiana*. *Agrobacterium* zawierające konstrukt efektorowy jest współinfiltrowane z *Agrobacterium* zawierającym konstrukt reporterowy, po czym następuje barwienie GUS. Skala – 0,5 cm.

Przykład 1. Identyfikacja kluczowej sekwencji promotora NAI2.

W celu badania aktywności wiązania DNA NAI1 dokonano ekspresji białka NAI1 jako białka fuzyjnego tioredoksyna (TRX) -His-tag w *Escherichia coli* i oczyszczono je za pomocą chromatografii do Ni. Masa cząsteczkowa oczyszczonego białka była nieco wyższa niż oczekiwano w porównaniu z teoretyczną wartością przewidywaną dla rekombinowanego białka, która wynosiła około 65 kDa (Fig. 1). Co więcej, odkryto, że NAI1 ma potencjał rozpoznawania kanonicznych i niekanonicznych sekwencji G-box w promotorze NAI2. Dlatego zbadano jego zdolność do wiązania się z kanonicznymi i niekanonicznymi G-boxami (G1 i G2) w promotorze NAI2 (Fig. 1). Wygenerowano biotynylowaną sondę DNA zawierającą G1 i G2 (sonda pNAI2, Fig. 1) i poddano ją elektroforetycznemu testowi przesunięcia ruchliwości (EMSA). Sekwencję pNAI2 przedstawiono jako Sekw. Nr. 1.

Kompleksy białko-DNA wykryto, gdy białka fuzyjne TRX-NAI1 inkubowano z sondą pNAI2 (Fig. 2). Nadmiar nieznakowanego pNAI2-G1/G2 był w stanie konkurować o aktywność wiązania DNA NAI1 (Ryc. 2). Możliwość niespecyficznego wiązania białka TRX została wyeliminowana, ponieważ nie zaobserwowano przesuniętych prążków, gdy białko TRX inkubowano z sondą (Fig. 2). Wyniki te wskazują na specyficzną interakcję między NAI1 z sondą pNAI2. Aby opracować wiązanie DNA NAI1 w sposób specyficzny dla sekwencji, oceniano aktywność wiązania białek fuzyjnych TRX-NAI1 z sondą pNAI2 w konkurencji z trzema zmutowanymi wersjami w sekwencji DNA sondy pNAI2: (i) mutacja kanonicznego G-box (pNAI2-mG1 / G2); (ii) mutacja niekanonicznego G-box (pNAI2-G1 / mG2) i (iii) mutacja obu G-box (pNAI2-mG1 / mG2). Co ciekawe, aktywność wiązania NAI1 z sondą pNAI2 była hamowana przez nadmiar nieznakowanego pNAI2-mG1 / G2 lub pNAI2-G1 / mG2 (Fig. 2A). Jednak pNAI2-mG1 / mG2 nie miał zdolności konkurencyjnej (Fig. 2A), co wskazuje, że obecność w obu sekwencjach G-box jest kluczowa dla wiązania NAI1 z sondą pNAI2.

Ponadto zweryfikowano zdolność wiązania NAI1 z motywami G1 i G2 w promotorze NAI2. NAI1 zlokalizowany w jądrze może aktywować promotor NAI2 jako czynnik transkrypcyjny poprzez swoje dwie sekwencje G-box (Fig. 3). Zbadano również za pomocą testu EMSA jego zdolność wiązania DNA w motywie podobnego do G-box (CACGTTT) w promotorze TSA1 i motywów E-box (CANNTG) w promotorach NAI2 i BGLU23. EMSA ujawniła, że białko NAI1 rozpoznaje sekwencje G-box (CACGTG) i G-box podobne (CACGTT) w promotorze NAI2, co sugeruje, że NAI1 jest bezpośrednim regulatorem genu NAI2. Jest to zgodne z faktem, że NAI1 reguluje ekspresję genu NAI2 u *Arabidopsis*. W przeciwieństwie do powyższej obserwacji, białko NAI1 nie związało się z sekwencją DNA promotora TSA1, który zawiera również motyw G-box podobny (CACGTTT).

Wynik potwierdza, że obecność motywu podobnego do G-box nie jest wystarczająca do wiązania NAI1, ale sekwencje flankujące obejmujące motywy podobne do G-box mogą wpływać na rozpoznawanie przez NAI1. Zatem element użyty jako promotor rozpoznawany przez białko NAI1 będzie zawierał sekwencję pNAI2.

Przykład 2. System ekspresji oparty na interakcji promotora NAI1/NAI2.

Aby potwierdzić, że NAI1 aktywuje promotor NAI2 u roślin, przeprowadzono test efektor-reporter (Fig. 4). Kiedy wprowadzono konstrukty: GFP-NAI1 sterowany promotorem CaMV35S (p35S: GFP-NAI1, patrz Id. Sekw. Nr 2) i reporter β -glukuronidazy sterowany przez promotor NAI2 (pNAI2: GUS, patrz Id. Sekw. Nr 3) w *N. benthamiana* przez agroinfiltrację, wykryto ciemnoniebieski sygnał barwienia GUS (Fig. 4B).

Sygnał GUS nie został wykryty, kiedy wprowadzano p35S: GFP zamiast p35S: GFP-NAI1. Wyniki wykazały, że białko GFP-NAI1 może aktywować promotor NAI2 w celu indukowania ekspresji GUS. W przeciwieństwie do tego, sygnał GUS jest słabo wykrywany konstruktem mającym mutację w dwóch elementach G-box w promotorze NAI2 (mut-pNAI2: GUS), co wskazuje, że GFP-NAI1 nie może aktywować zmutowanego promotora NAI2 (Fig. 4B). Wynik dowodzi, że NAI1 aktywuje promotor NAI2 poprzez interakcję z elementami G-box w komórkach roślinnych. Gdy użyto konstruktu GFP-NAI1 z promotorem

NAI1 (pNAI1: GFP-NAI1), nie zaobserwowano ekspresji genu GUS (Fig. 4B). Wyniki potwierdzają również, że promotor NAI1 nie jest wystarczający do indukowania NAI1-GFP w liściach *N. benthamiana*. W opisywanych przykładach zostały wykorzystane następujące elementy:

Sekwencja kodująca cDNA białka NAI1 przedstawiona jako Sekw. Nr. 4.

Kodowane przez nią białko NAI1, którego sekwencja aminokwasowa została przedstawiona jako Sekw. Nr. 5.

Sekwencja kodująca cDNA białka fuzyjnego GFP-NAI1 przedstawiona jako Sekw. Nr. 6.

Kodowane przez nią fuzyjne GFP-NAI1, którego sekwencja aminokwasowa została przedstawiona jako Sekw. Nr. 7.

Sekwencja promotora NAI2 przedstawiona jako Sekw. Nr. 8.

Ponadto wykorzystano następujące metody:

Uzyskanie białka NAI1

Otrzymano plazmidowy DNA niosący cDNA NAI1 w wektorze wejściowym Gateway pDONR201 (klon nr REGIo476B122D) z Source BioScience (Nottingham, UK). Region kodujący NAI1 w pDONR201 przeniesiono do pET32a-GW. PET32a-GW pochodzi z pET32a (Novagen, Madison, Wisconsin, USA), który został zmodyfikowany przy użyciu Gateway Vector Conversion System (Invitrogen) [30]. W celu ekspresji rekombinowanego białka (TRX-NAI1-His-Tag) w bakterii plazmid wprowadzono do kompetentnych komórek BL21 (DE3) pLysS Rosetta (Novagen). Ekspresję rekombinowanego białka indukowano przez hodowanie komórek w 150 ml pożywki LB zawierającej 0,4 mM izopropyl- β -D-1-tiogalaktopiranozyd (IPTG) przez 18 godzin w 18°C. W celu oczyszczenia białka komórki zebrano z hodowli indukcyjnej i ponownie zawieszono w buforze do lizy CelLytic B (Sigma). Komórki bakteryjne poddano lizie przez sonikację, następnie odwirowano, a supernatant zmieszano w równych proporcjach z buforem równoważącym (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol) przed nałożeniem do kolumny Ni-NTA (Qiagen). Po trzykrotnym przemyciu roztworem imidazolu o stężeniu w zakresie od 20–100 mM, białko TRX-NAI1-His-tag eluowano przy użyciu 500 mM imidazolu. Rozpuszczalnik białkowy zastąpiono PBS (10 mM fosforan sodu, pH 7,2 i 130 mM NaCl) przez dializę, a następnie zatężono za pomocą urządzenia Amicon Ultra Centrifugal (Thermo Fisher).

Test przesunięcia ruchliwości elektroforetycznej

Biotynylowaną dwuniciową sondę DNA pNAI2-G1 / G2 uzyskano poprzez zmieszanie 50- μ m mieszaniny komplementarnych oligonukleotydów w 10 mM Tris-Cl, 50 mM NaCl i 1 mM EDTA (pH 8,0) przez ogrzewanie do 95°C przez 5 minut, a następnie powolne chłodzenie do temperatury pokojowej. Reakcje wiązania indukowano przez chłodzenie na lodzie przez 30 minut, a następnie rozdzielano przez 6% PAGE. Po elektroforezie produkty przeniesiono na dodatnio naładowaną nylonową membranę (Thermo Fisher). Oddziaływania DNA-białko wizualizowano tą samą metodą co Western Blot, z wyjątkiem tego, że błonę blokowano 3% odtłuszczonym mlekiem i sondowano awidyną sprzężoną z peroksydazą chrzanową (Pierce Avidin, Thermo Fisher). Testy EMSA przeprowadzono przy użyciu 25x, 50x i 100x nadmiaru nieznakowanych sond w reakcjach wiązania.

Analiza lokalizacji subkomórkowej NAI1

Do produkcji roślin transgenicznych wykorzystano szczep Columbia (Col-0) mutantów insercyjnych *A. thaliana*, które wytwarzają GFP-NAI1. Promotor, region kodujący i regiony z kodonem terminacyjnym genu NAI1 amplifikowano metodą PCR z DNA genomu *Arabidopsis* jako matrycę. Amplifikowane fragmenty DNA wprowadzono do wektora wejściowego Gateway. Następnie cały region przeniesiono do wektora pGWB501 w celu wytworzenia pGWB501 / ProNAI1: sGFP-NAI1: TerNAI1. Wektor wprowadzono następnie do szczepu *Agrobacterium tumefaciens*, a następnie transformowano do *Arabidopsis*.

Do wytworzenia konstruktu nadekspresji pGWB406-NAI1, który składał się z cDNA ORF NAI1 niosącego N-końcówą fuzyję z GFP, pod kontrolą promotora wirusa mozaiki kalafiora (CaMV) 35S, zastosowano binarny wektor Gateway pGWB406 [31]. Powstały plazmid, pGWB406-NAI1, transformowano do szczepu *A. tumefaciens* GV3101 (pMP90RK) przez elektroporację. Za kontrolę służył pGWB406, który ekspresjuje GFP pod kontrolą promotora CaMV 35S [31]. Bakterie hodowano w pożywce lizogennej (LB) zawierającej ryfampicynę, kanamycynę i spektynomycynę w 28°C przez 2 dni, zebrano i ponownie zawieszono w pożywce do infiltracji (10 mM MES, 10 mM MgCl₂ i 150 μ M acetylosyringonu). Zawiesiny bakteryjne doprowadzono do OD₆₀₀ = 1,0, inkubowano przez 4 godziny w 28°C, a następnie infiltrowano 1 ml strzykawką bez igły do odosiowych przestrzeni powietrznych 4-tygodniowych liści *N. benthamiana*. Aby stłumić wyciszenie genów, dokonaliśmy koinfiltracji *Agrobacterium* (OD₆₀₀ = 0,5) zawierającej supresor wyciszający p19 wirusa krzaczastej karłowatości pomidora

(TBSV) [32]. Po 36 do 40 godzinach fluorescencję GFP obserwowano w laserowym mikroskopie konfokalnym (LSM 880, Zeiss).

Analiza ekspresji GUS

Region promotorowy genu NAI2 o długości 635 bp amplifikowano metodą PCR z genomowego DNA *Arabidopsis thaliana* Col-0. Sekwencję promotora NAI2 zweryfikowano, a następnie sklonowano ją do pBI121 (Clontech) w miejscach HindIII i BamHI, zastępując promotor CaMV35S w celu wytworzenia pNAI2: GUS. Aby wygenerować mut-pNAI2: GUS, przeprowadzono PCR typu overlap extension PCR [33] w celu zastąpienia sekwencji rdzeniowej kanonicznych i niekanonicznych elementów G-box (G1 / G2-box) w promotorze NAI2. W skrócie, dwie serie reakcji PCR przeprowadzono z użyciem genomowego DNA *Arabidopsis* jako matrycy i starterów (pNAI2HindIIIF i nie dopełniacza dla pNAI2-mG1 / mG2p; NAI2BamHIR i nie przednia dla pNAI2-mG1 / mG2p). Produkty otrzymane z powyższych reakcji PCR mieszano w stosunku 1 : 1, a następnie przeprowadzono trzecią reakcję PCR z użyciem starterów (pNAI2HindIIIF i pNAI2BamHIR) w celu amplifikacji zmutowanych kaset G1 / G2 zawierających fragment promotora NAI2. Zmutowaną sekwencję w promotorze NAI2 zweryfikowano, a następnie wklonowano ją do pBI121 w miejscach HindIII i BamHI. Powstałe plazmidy wprowadzono do szczepu EHA105 *A. tumefaciens* przez elektroporację. Szczepy *Agrobacterium* zawierające efektor (p35S: GFP, p35S: GFP-NAI1, pNAI1: GFP-NAI1) lub konstrukty reporterowe mieszano odpowiednio 1 : 1, a następnie koinfiltrowano do liści *N. benthamiana* na etapie 5 liści przy użyciu strzykawki o pojemności 1 ml. Ektopowy supresor wyciszający P19 był współinfiltrowany przy OD600 = 0,3. Po infiltracji rośliny utrzymywano przez 2 dni w komorze wzrostowej w 28°C w warunkach fotoperiodu 16 godzin światła.

Barwienie GUS przeprowadzono zgodnie z wcześniejszym opisem [34] z niewielkimi modyfikacjami. Infiltrowane liście pocięto na kawałki i namoczono w buforze barwiącym GUS (100 mM fosforan sodu, 1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolilo- β -D-glukuronid, 0,5 mM żelazocyjanek potasu, 0,5 mM żelazocyjanek potasu, 10 mM Na₂EDTA, pH 7,0), a następnie infiltrowano pod próżnią przez 5 minut i inkubowano w 37°C przez noc. Po wybarwieniu próbek liści na obecność GUS, potraktowano je 70% etanolem do całkowitego usunięcia pigmentów, takich jak chlorofile, i przemyto je wodą destylowaną w celu odbarwienia.

Bibliografia

1. Iversen TH. The morphology, occurrence, and distribution of dilated cisternae of the endoplasmic reticulum in tissues of plants of the *Cruciferae*. *Protoplasma* 1970; 71:467–77.
2. Matsushima R, Hayashi Y, Yamada K, Shimada T, Nishimura M, Hara-Nishimura I. The ER body, a novel endoplasmic reticulum-derived structure in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 2003; 44:661–6.
3. Gunning BES. The identity of mystery organelles in *Arabidopsis* plants expressing GFP. *Trends Plant Sci* 1998; 3:417.
4. Matsushima R, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I. A novel ER-derived compartment, the ER body, selectively accumulates a β -glucosidase with an ER-retention signal in *Arabidopsis*. *Plant J* 2003; 33:493–502.
5. Nakazaki A, Yamada K, Kunieda T, Tamura K, Hara-Nishimura I, Shimada T. Biogenesis of leaf endoplasmic reticulum body is regulated by both jasmonate-dependent and independent pathways. *Plant Signal Behav* 2019; 14:e1622982.
6. Nakazaki A, Yamada K, Kunieda T, Sugiyama R, Hirai YM, Tamura K, et al. Leaf endoplasmic reticulum bodies identified in *Arabidopsis* rosette leaves are involved in defense against herbivory. *Plant Physiol* 2019; 179:1515–24.
7. Stefanik N, Bizan J, Wilkens A, Tarnawska-Glatt K, Goto-Yamada S, Strzałka K, et al. NAI2 and TSA1 drive differentiation of constitutive and inducible ER body formation in Brassicaceae. *Plant Cell Physiol* 2020; 61:722–34.
8. Matsushima R, Hayashi Y, Kondo M, Shimada T, Nishimura M, Hara-Nishimura I. An endoplasmic reticulum-derived structure that is induced under stress conditions in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2002; 130:1807–14.
9. Yamada K, Goto-Yamada S, Nakazaki A, Kunieda T, Kuwata K, Nagano AJ, et al. Endoplasmic reticulum-derived bodies enable a single-cell chemical defense in Brassicaceae plants. *Commun Biol* 2020; 3:21.
10. Nakano RT, Piślewska-Bednarek M, Yamada K, Edger PP, Miyahara M, Kondo M, et al. PYK10 myrosinase reveals a functional coordination between ER bodies and glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 2017; 89:204–20.

11. Nakano RT, Yamada K, Bednarek P, Nishimura M, Hara-Nishimura I. ER bodies in plants of the Brassicales order: Biogenesis and association with innate immunity. *Front Plant Sci* 2014; 5:73.
12. Lüthy B, Matile P. The mustard oil bomb: rectified analysis of the subcellular organisation of the myrosinase system. *Biochem Physiol Pflanzen* 1984; 179:5–12.
13. Matsushima R, Fukao Y, Nishimura M, Hara-Nishimura I. *NAI1* gene encodes a basic-helix-loop-helix-type putative transcription factor that regulates the formation of an endoplasmic reticulum-derived structure, the ER body. *Plant Cell* 2004; 16:1536–49.
14. Yamada K, Nagano AJ, Nishina M, Hara-Nishimura I, Nishimura M. NAI2 is an endoplasmic reticulum body component that enables ER body formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 2008; 20:2529–40.
15. Geem KR, Kim DH, Lee DW, Kwon Y, Lee J, Kim JH, et al. Jasmonic acid-inducible TSA1 facilitates ER body formation. *Plant J* 2019; 97:267–80.
16. Voronova A, Baltimore D. Mutations that disrupt DNA binding and dimer formation in the E47 helix-loop-helix protein map to distinct domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:4722–6.
17. Swanson HI, Chan WK, Bradfield CA. DNA binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins. *J Biol Chem* 1995; 270:26292–302.
18. Bai M-Y, Fan M, Oh E, Wang Z-Y. A triple helix-loop-helix/basic helix-loop-helix cascade controls cell elongation downstream of multiple hormonal and environmental signaling pathways in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2012; 24:4917–29.
19. MacAlister CA, Bergmann DC. Sequence and function of basic helix-loop-helix proteins required for stomatal development in *Arabidopsis* are deeply conserved in land plants. *Evol Dev* 2011; 13:182–92.
20. Pires N, Dolan L. Origin and diversification of basic-helix-loop-helix proteins in plants. *Mol Biol Evol* 2010; 27:862–74.
21. Yi K, Menand BB, Bell E, Dolan L. A basic helix-loop-helix transcription factor controls cell growth and size in root hairs. *Nat Genet* 2010; 42:264–7.
22. Toledo-Ortiz G, Huq E, Quail PH. The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell* 2003; 15:1749–70.
23. Meshi T, Iwabuchi M. Plant transcription factors. *Plant Cell Physiol* 1995; 36:1405–20.
24. Heim MA, Jakoby M, Werber M, Martin C, Weisshaar B, Bailey PC. The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol Biol Evol* 2003; 20:735–47.
25. Van Moerkercke A, Steensma P, Gariboldi I, Espoz J, Purnama PC, Schweizer F, et al. The basic helix-loop-helix transcription factor BIS2 is essential for monoterpenoid indole alkaloid production in the medicinal plant *Catharanthus roseus*. *Plant J* 2016; 88:3–12.
26. Van Moerkercke A, Steensma P, Schweizer F, Pollier J, Gariboldi I, Payne R, et al. The bHLH transcription factor BIS1 controls the iridoid branch of the monoterpenoid indole alkaloid pathway in *Catharanthus roseus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112:8130–5.
27. Mertens J, Pollier J, Vanden Bossche R, Lopez-Vidriero I, Franco-Zorrilla JM, Goossens A. The bHLH transcription factors TSAR1 and TSAR2 regulate triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* 2016; 170:194–210.
28. Tamura K, Yoshida K, Hiraoka Y, Sakaguchi D, Chikugo A, Mochida K, et al. The basic helix-loop-helix transcription factor GubHLH3 positively regulates soyasaponin biosynthetic genes in *Glycyrrhiza uralensis*. *Plant Cell Physiol* 2018; 59:783–96.
29. O'Malley RC, Huang SC, Song L, Lewsey MG, Bartlett A, Nery JR, et al. Cistrome and epicistrome features shape the regulatory DNA landscape. *Cell* 2016; 165:1280–92.
30. Yamada K, Fukao Y, Hayashi M, Fukazawa M, Suzuki I, Nishimura M. Cytosolic HSP90 regulates the heat shock response that is responsible for heat acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 2007; 282:37794–804.
31. Nakagawa T, Suzuki T, Murata S, Nakamura S, Hino T, Maeo K, et al. Improved Gateway binary vectors: high-performance vectors for creation of fusion constructs in transgenic analysis of plants. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71:2095–100.
32. Lindbo JA. High-efficiency protein expression in plants from agroinfection-compatible *Tobacco mosaic virus* expression vectors. *BMC Biotechnol* 2007; 7:52.
33. Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain-reaction. *Gene* 1989; 77:51–9.
34. Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 1987; 6:3901–7.

Wykaz sekwencji

<110> Uniwersytet Jagielloński
 <120> Promotor aktywowany przez białko NAI1 oraz zawierający go układ ekspresyjny
 <130> PK/7891/RW
 <160> 8
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana
 <400> 1
 aaaaataaaa gccacgtgaa ttctattatt aaattaaaaa gccacgttga gttattttac 60
 <210> 2
 <211> 2073
 <212> DNA
 <213> sztuczna
 <220>
 <223> p35S:GFP-NAI1
 <400> 2
 tgagactttt caacaaaggg taatatccgg aaacctcctc ggattccatt gccacgctat 60
 ctgtcacttt attgtgaaga tagtggaaaa ggaagggtgc tctacaaat gccatcattg 120
 cgataaagga aagggcatcg ttgaagatgc ctctgccgac agtgggtcca aagatggacc 180
 cccacccacg aggagcatcg tggaaaaaga agacgttcca accacgtctt caaagcaagt 240
 ggattgatgt gatattctcca ctgacgtaag ggatgacgca caatcccaact atccttcgca 300
 agacccttcc tctatataag gaagttcatt tcatttgagag agaacacggg ggactctaga 360
 ggatccatgg tgagcaaggg cgaggagctg ttcaccgggg tggtgcccat cctgggtcgag 420
 ctggacggcg acgtgaacgg ccacaagtgc agcgtgtccg gcgagggcga gggcgatgcc 480
 acctacggca agctgacctt gaagttcatt tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgccctgg 540
 cccaccctcg tgaccacctt cacctacggc gtgcagtgtc tcagccgcta ccccgaccac 600
 atgaagcagc acgacttctt caagtccgcc atgcccgaag gctacgtcca ggagcgcacc 660
 atcttcttca aggacgacgg caactacaag acccgcgccg aggtgaagtt cgagggcgac 720
 accctggtga accgcacgca gctgaagggc atcgacttca aggaggacgg caacatcctg 780
 gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc cacaacgtct atatcatggc cgacaagcag 840

```

aagaacggca tcaaggtgaa cttcaagatc cgccacaaca tcgaggacgg cagcgtgcag      900
ctcgccgacc actaccagca gaacaccccc atcgggcgacg gccccgtgct gctgccccgac      960
aaccactacc tgagcaccca gtccgccttg agcaaagacc ccaacgagaa gcgcgatcac      1020
atggtcctgc tggagttcgt gaccgcccgc gggatcactc acggcatgga cgagctgtac      1080
atcacaagtt tgtacaaaaa agcaggctcc atggatgatt caagctttat ggatttgatg      1140
atcgacactg acgagtatct gatcgatgac tgggaatccg atttcccgat atgccccgaa      1200
actaacacca accccggttc cgagtctgga tctggaaccg ggtttgagtt gctagcagaa      1260
agaccaacga agcaaagaa aaccaacaac aacatgaatt caacatcttc ttctccgtcg      1320
tcttcttctt cttctggttc tcgcacgtca caagtgatct cathttgggtc tccagacacg      1380
aaaaccaacc cggtcgagac atctttgaac ttctccaacc aagtaagcat ggatcagaaa      1440
gtgggggtcga aaagaaaaga ttgtgttaac aatggaggaa gaagagaacc acatctattg      1500
aaagaacatg ttttggtcga acgaaaacgt cgacaaaagc tcaacgagcg tttgattgct      1560
ctctctgctc ttcttctctg cctcaaaaag acggacaagg caacagttct tgaagatgcc      1620
atcaaacatt tgaacaact tcaagagcgg gtaaagaagc tggaggagga gcgagtgggtg      1680
accaagaaaa tggatcaatc aattatattg gtgaagagat ctcaagtgtc tttagatgat      1740
gattcttcat cttattcttc tacttgctct gctgcgtctc ctctgtcttc ttcttcggac      1800
gaagtttcga tcttcaaaca aacaatgcct atgatcgaag cccgagtttc agacagagat      1860
ttgttgatta gagtccattg tgagaagaac aaaggggtgta tgattaagat ctttaagttcc      1920
ttggagaagt ttctgtctga agtagtcaat agcttcactt taccatttgg aaattcaact      1980
ctcgttataa ccattctcac taagatggac aacaaatctt ctcgaccagt tgaagaagtg      2040
gtgaagaaca taagagttgc gttagctgaa taa      2073

```

```

<210> 3
<211> 2481
<212> DNA
<213> sztuczna

```

```

<220>
<223> pNAI2:GUS

```

```

<400> 3
aagcttgccg aacgaaaatt taattatagc cgatcattga gtttttagggc cgtgacacat      60
gtgggttgta gttctgtaca agtacaatca tatatatgta ttttaattttc tcatgtagca      120
cgctaataat atcttatagt ataaataaat accaagtcta acagatacga tttggtagta      180
gtgtagtgaa catcgcatca tttatttata tcagcaaagt agttcacaat acgtggacta      240

```

tggcctatga ggataattaa ttatactcta atgattatac ttctatttca taatattgta	300
gtaagttaaa ctgattaata gttggattta ccagcattag tggattccat tatagatata	360
tttcaataat aaacttttcg ttttttcaact ttttttaaaaa tatcattttt cttagtcttt	420
cttttggcaa gattaagagt gggataatca taatttatag gcgtttcaca tacacagaaa	480
ctaatagaaga caagaataaaa attaaaaata gcgttgaatt ctttgtaatt aggaacgtgg	540
aatatatata aaaataaaaag ccacgtgaat tctattatta aattaaaaag ccacgttgag	600
ttattttact ttggttttat ttaaagtctt gtttttcctc aagctggatc cccgggtggt	660
cagtcacctta tgttacgtcc tgtagaaacc ccaaccctgt aaatcaaaaa actcgacggc	720
ctgtgggcat tcagtctgga tcgcgaaaac tgtggaattg atcagcgttg gtgggaaagc	780
gcgttacaag aaagccgggc aattgctgtg ccaggcagtt ttaacgatca gttcgccgat	840
gcagatatcc gtaattatgc gggcaacgtc tggtatcagc gcaagtctt tataccgaaa	900
ggttgggacg gccagcgtat cgtgctgcgt ttcgatgcgg tcaactatta cggcaaagtg	960
tgggtcaata atcaggaagt gatggagcat cagggcggct atacgccatt tgaagccgat	1020
gtcacgccgt atgttattgc cgggaaaagt gtacgtatca ccgtttgtgt gaacaacgaa	1080
ctgaactggc agactatccc gccgggaatg gtgattaccg acgaaaacgg caagaaaaag	1140
cagtcttact tccatgattt ctttaactat gccggaatcc atcgacgcgt aatgctctac	1200
accacgccga acacctgggt ggacgatatc accgtggtga cgcattgtgc gcaagactgt	1260
aaccacgcgt ctgttgactg gcagggtggt gccaatggtg atgtcagcgt tgaactgcgt	1320
gatgcggatc aacaggtggt tgcaactgga caaggcacta gcgggacttt gcaagtgggt	1380
aatccgcacc tctggcaacc gggatgaagt tatctctatg aactgtgcgt cacagccaaa	1440
agccagacag agtgtgatat ctaccgcctt cgcgtcggca tccggtcagt ggcagtgaag	1500
ggcgaacagt tctgattaa ccacaaaccg ttctacttta ctggctttgg tcgtcatgaa	1560
gatgcggact tgcgtggcaa aggattcgat aacgtgctga tggtgcaaga ccacgcatta	1620
atggactgga ttggggccaa ctctaccgt acctgcatt accttaacgc tgaagagatg	1680
ctcgactggg cagatgaaca tggcatcgtg gtgattgatg aaactgctgc tgtcggttt	1740
aacctctctt taggcattgg ttctgaagcg ggcaacaagc cgaaagaact gtacagcgaa	1800
gaggcagtca acggggaac tcagcaagcg cacttacagg cgattaaaga gctgatagcg	1860
cgtgacaaaa accaccaag cgtggtgatg tggagtattg ccaacgaacc ggatacccg	1920
ccgcaagggt cacgggaata ttctgcgcca ctggcggaag caacgcgtaa actcgaccgc	1980

```

acgcgtccga tcacctgcgt caatgtaatg ttctgcgacg ctacacaccga taccatcagc      2040
gatctctttg atgtgctgtg cctgaaccgt tattacggat ggtatgtcca aagcggcgat      2100
ttggaaacgg cagagaaggt actggaaaaa gaacttctgg cctggcagga gaaactgcat      2160
cagccgatta tcatcaccga atacggcgtg gatacgttag ccgggctgca ctcaatgtac      2220
accgacatgt ggagtgaaga gtatcagtgt gcatggcttg atatgtatca ccgcgtcttt      2280
gatcgcgtca gcgcgcgtcg cggatgaacag gtatggaatt tcgccgattt tgcgacctcg      2340
caaggcatat tgcgcgttgg cggtaacaag aaagggatct tcaactcgca ccgcaaacgg      2400
aagtcggcgg cttttctgct gcaaaaacgc tggactggca tgaacttcgg tgaaaaacgg      2460
cagcagggag gcaaacatg a                                     2481

```

```

<210> 4
<211> 963
<212> DNA
<213> sztuczna

```

```

<220>
<223> NAI1_cDNA

```

```

<400> 4
atggatgatt caagctttat ggatttgatg atcgacactg acgagtatct gatcgatgac      60
tgggaatccg atttcccgat atgcggggaa actaacacca accccggttc cgagtctgga      120
tctggaaccg ggtttgagtt gctagcagaa agaccaacga agcaaatgaa aaccaacaac      180
aacatgaatt caacatcttc ttctccgtcg tcttcttctt cttctggttc tcgcacgtca      240
caagtgatct catttgggtc tccagacacg aaaaccaacc cggtcgagac atctttgaac      300
ttctccaacc aagtaagcat ggatcagaaa gtggggtcga aaagaaaaga ttgtgttaac      360
aatggaggaa gaagagaacc acatctattg aaagaacatg ttttggtga acgaaaacgt      420
cgacaaaagc tcaacgagcg tttgattgct ctctctgctc ttcttcctgg cctcaaaaag      480
acggacaagg caacagttct tgaagatgcc atcaaacatt tgaacaact tcaagagcgg      540
gtaaagaagc tggaggagga gcgagtggcg accaagaaaa tggatcaatc aattatattg      600
gtgaagagat ctcaagtgtg tttagatgat gattcttcat cttattcttc tacttgctct      660
gctgcgtctc ctctgtcttc ttcttcggac gaagtttcga tcttcaaaca aacaatgcct      720
atgatcgaag cccgagtttc agacagagat ttgttgatta gagtccattg tgagaagaac      780
aaagggtgta tgattaagat ctttaagttc ttggagaagt ttcgtcttga agtagtcaat      840
agcttcactt taccatttgg aaattcaact ctcggtataa ccattctcac taagatggac      900
aacaaatctt ctcgaccagt tgaagaagtg gtgaagaaca taagagttgc gtttagctgaa      960

```

taa

963

<210> 5
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 5

Met Asp Asp Ser Ser Phe Met Asp Leu Met Ile Asp Thr Asp Glu Tyr
 1 5 10 15

Leu Ile Asp Asp Trp Glu Ser Asp Phe Pro Ile Cys Gly Glu Thr Asn
 20 25 30

Thr Asn Pro Gly Ser Glu Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Glu Leu Leu
 35 40 45

Ala Glu Arg Pro Thr Lys Gln Met Lys Thr Asn Asn Asn Met Asn Ser
 50 55 60

Thr Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Arg Thr Ser
 65 70 75 80

Gln Val Ile Ser Phe Gly Ser Pro Asp Thr Lys Thr Asn Pro Val Glu
 85 90 95

Thr Ser Leu Asn Phe Ser Asn Gln Val Ser Met Asp Gln Lys Val Gly
 100 105 110

Ser Lys Arg Lys Asp Cys Val Asn Asn Gly Gly Arg Arg Glu Pro His
 115 120 125

Leu Leu Lys Glu His Val Leu Ala Glu Arg Lys Arg Arg Gln Lys Leu
 130 135 140

Asn Glu Arg Leu Ile Ala Leu Ser Ala Leu Leu Pro Gly Leu Lys Lys
 145 150 155 160

Thr Asp Lys Ala Thr Val Leu Glu Asp Ala Ile Lys His Leu Lys Gln
 165 170 175

Leu Gln Glu Arg Val Lys Lys Leu Glu Glu Glu Arg Val Val Thr Lys
 180 185 190

Lys Met Asp Gln Ser Ile Ile Leu Val Lys Arg Ser Gln Val Tyr Leu
 195 200 205

Asp Asp Asp Ser Ser Ser Tyr Ser Ser Thr Cys Ser Ala Ala Ser Pro
 210 215 220

Leu Ser Ser Ser Ser Asp Glu Val Ser Ile Phe Lys Gln Thr Met Pro
 225 230 235 240

Met Ile Glu Ala Arg Val Ser Asp Arg Asp Leu Leu Ile Arg Val His
 245 250 255

Cys Glu Lys Asn Lys Gly Cys Met Ile Lys Ile Leu Ser Ser Leu Glu
 260 265 270

Lys Phe Arg Leu Glu Val Val Asn Ser Phe Thr Leu Pro Phe Gly Asn
 275 280 285

Ser Thr Leu Val Ile Thr Ile Leu Thr Lys Met Asp Asn Lys Phe Ser
 290 295 300

Arg Pro Val Glu Glu Val Val Lys Asn Ile Arg Val Ala Leu Ala Glu
 305 310 315 320

<210> 6

<211> 1707

<212> DNA

<213> sztuczna

<220>

<223> GFP-NAI1_cDNA

<400> 6

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac	60
ggcgacgtga acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgcacacctac	120
ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc	180
ctcgtgacca ctttcaccta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag	240
cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc	300
ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg	360
gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac	420
aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac	480
ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc	540

gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccc tgctgctgcc cgacaaccac 600
 tacctgagca cccagtcgcg cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgoga tcacatggtc 660
 ctgctggagt ccgtgaccgc cgcggggatc actcacggca tggacgagct gtacatcaca 720
 agtttgtaca aaaaagcagg ctccatggat gattcaagct ttatggattt gatgatcgac 780
 actgacgagt atctgatoga tgactgggaa tccgatttcc cgatatgogg ggaaactaac 840
 accaaccccc gttccgagtc tggatctgga accgggtttg agttgctagc agaaagacca 900
 acgaagcaaa tgaaaaccaa caacaacatg aattcaacac cttctttctcc gtctgtctct 960
 tcttcttctg gttctcgac gtcacaagtg atctcatttg ggtctccaga cagaaaacc 1020
 aaccgggtcg agacatcttt gaacttctcc aaccaagtaa gcatggatca gaaagtgggg 1080
 tcgaaaagaa aagattgtgt taacaatgga ggaagaagag aaccacatct attgaaagaa 1140
 catgttttgg ctgaacgaaa acgtcgacaa aagctcaacg agcgtttgat tctctctct 1200
 gctcttcttc ctggcctcaa aaagacggac aaggcaacag ttcttgaaga tgccatcaaa 1260
 catttgaaac aacttcaaga gcgggtaaag aagctggagg aggagcgagt ggtgaccaag 1320
 aaaatggatc aatcaattat attggtgaag agatctcaag tgtattttaga tgatgattct 1380
 tcatcttatt cttctacttg ctctgctgcg tctcctctg cttcttcttc ggacgaagtt 1440
 tcgatcttca aacaaacaat gcctatgatc gaagcccgag tttcagacag agatttggtg 1500
 attagagtc c attgtgagaa gaacaaaggg tgtatgatta agatcttaag ttccttgag 1560
 aagtttcgtc ttgaagtagt caatagcttc actttaccac ttggaaattc aactctcggt 1620
 ataaccattc tcaactaagat ggacaacaaa ttttctcgac cagttgaaga agtgggtgaag 1680
 aacataagag ctgcgttagc tgaataa 1707

<210> 7

<211> 568

<212> PRT

<213> sztuczna

<220>

<223> GFP-NAI1_protein

<400> 7

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60

Phe Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 130 135 140

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 165 170 175

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 180 185 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
 195 200 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 210 215 220

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Ile Thr
 225 230 235 240

Ser Leu Tyr Lys Lys Ala Gly Ser Met Asp Asp Ser Ser Phe Met Asp
 245 250 255

Leu Met Ile Asp Thr Asp Glu Tyr Leu Ile Asp Asp Trp Glu Ser Asp
 260 265 270

Phe Pro Ile Cys Gly Glu Thr Asn Thr Asn Pro Gly Ser Glu Ser Gly
 275 280 285

Ser Gly Thr Gly Phe Glu Leu Leu Ala Glu Arg Pro Thr Lys Gln Met
 290 295 300

Lys Thr Asn Asn Asn Met Asn Ser Thr Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser
 305 310 315 320

Ser Ser Ser Gly Ser Arg Thr Ser Gln Val Ile Ser Phe Gly Ser Pro
 325 330 335

Asp Thr Lys Thr Asn Pro Val Glu Thr Ser Leu Asn Phe Ser Asn Gln
 340 345 350

Val Ser Met Asp Gln Lys Val Gly Ser Lys Arg Lys Asp Cys Val Asn
 355 360 365

Asn Gly Gly Arg Arg Glu Pro His Leu Leu Lys Glu His Val Leu Ala
 370 375 380

Glu Arg Lys Arg Arg Gln Lys Leu Asn Glu Arg Leu Ile Ala Leu Ser
 385 390 395 400

Ala Leu Leu Pro Gly Leu Lys Lys Thr Asp Lys Ala Thr Val Leu Glu
 405 410 415

Asp Ala Ile Lys His Leu Lys Gln Leu Gln Glu Arg Val Lys Lys Leu
 420 425 430

Glu Glu Glu Arg Val Val Thr Lys Lys Met Asp Gln Ser Ile Ile Leu
 435 440 445

Val Lys Arg Ser Gln Val Tyr Leu Asp Asp Asp Ser Ser Ser Tyr Ser
 450 455 460

Ser Thr Cys Ser Ala Ala Ser Pro Leu Ser Ser Ser Ser Asp Glu Val
 465 470 475 480

Ser Ile Phe Lys Gln Thr Met Pro Met Ile Glu Ala Arg Val Ser Asp
 485 490 495

Arg Asp Leu Leu Ile Arg Val His Cys Glu Lys Asn Lys Gly Cys Met
 500 505 510

Ile Lys Ile Leu Ser Ser Leu Glu Lys Phe Arg Leu Glu Val Val Asn
515 520 525

Ser Phe Thr Leu Pro Phe Gly Asn Ser Thr Leu Val Ile Thr Ile Leu
530 535 540

Thr Lys Met Asp Asn Lys Phe Ser Arg Pro Val Glu Glu Val Val Lys
545 550 555 560

Asn Ile Arg Val Ala Leu Ala Glu
565

<210> 8
<211> 639
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 8
gccgaacgaa aatttaatta tagccgatca ttgagtttta gggtcgtgac acatgtggtt 60
gtcagttctg tacaagtaca atcatatata tgtatttaaat tttctcatgt agcacgctaa 120
tattatctta tagtataaat aaataccaag tctaacagat acgatttggt agtagtgtag 180
tgaacatcgc attatttatt tatatcagca aagtagttca caatacgtgg actatggcct 240
atgaggataa ttaattatac tctaattgatt atacttctat ttcataatat tgtagtaagt 300
taaactgatt aatagttgga ttaccagca ttagtggtt ccattataga tatatttcaa 360
taataaaactt ttcgtttttt cactttttta aaaatatcat ttttcttagt ctttcttttg 420
gcaagattaa gagggggata atcataattt ataggcggtt cacatacaca gaaactaatg 480
aagacaagaa taaaattaaa aatagcggtt aattctttgt aattaggaac gtggaatata 540
tataaaaata aaagccacgt gaattctatt attaaattaa aaagccacgt tgagttattt 600
tactttggtt ttatttaaag tcttggtttt cctcaagct 639

Zastrzeżenia patentowe

1. Promotor aktywowany przez białko NAI1 zawierający sekwencję przedstawioną jako Sekw. Nr. 1.
2. Promotor według zastrz. 1 posiadający sekwencję przedstawioną jako Sekw. Nr. 8.
3. Układ ekspresyjny zawierający kasetę efektora i kasetę reportera, **znamienny tym**, że kasetę efektora zawiera gen kodujący białko NAI1 lub gen kodujący białko fuzyjne zawierające białko NAI1 pod kontrolą dowolnego znanego, korzystnie indukowalnego, promotora, natomiast kasetę reportera zawiera gen kodujący białko reporterowe pod kontrolą promotora aktywowanego przez białko NAI1, przy czym promotor aktywowany przez białko NAI1 zawiera sekwencję przedstawioną jako Sekw. Nr. 1.
4. Układ ekspresyjny według zastrz. 3, **znamienny tym**, że promotor aktywowany przez białko NAI1 posiada sekwencję przedstawioną jako Sekw. Nr. 8.
5. Układ ekspresyjny według zastrz. 3, **znamienny tym**, że gen kodujący białko NAI1 koduje białko o sekwencji przedstawionej jako Sekw. Nr. 5.

6. Układ ekspresyjny według zastrz. 3, **znamienny tym**, że gen kodujący białko NAI1 posiada sekwencję przedstawioną jako Sekw. Nr. 4.
7. Układ ekspresyjny według zastrz. 3, **znamienny tym**, że gen kodujący białko fuzyjne zawierające białko NAI1 koduje białko o sekwencji przedstawionej jako Sekw. Nr. 7.
8. Układ ekspresyjny według zastrz. 3, **znamienny tym**, że gen kodujący białko fuzyjne zawierające białko NAI1 posiada sekwencję przedstawioną jako Sekw. Nr. 6.
9. Układ ekspresyjny według zastrz. 3, **znamienny tym**, że kaseta efektora posiada sekwencję przedstawioną jako Sekw. Nr. 2.
10. Układ ekspresyjny według zastrz. 3, **znamienny tym**, że kaseta reportera posiada sekwencję przedstawioną jako Sekw. Nr. 3.

Rysunki

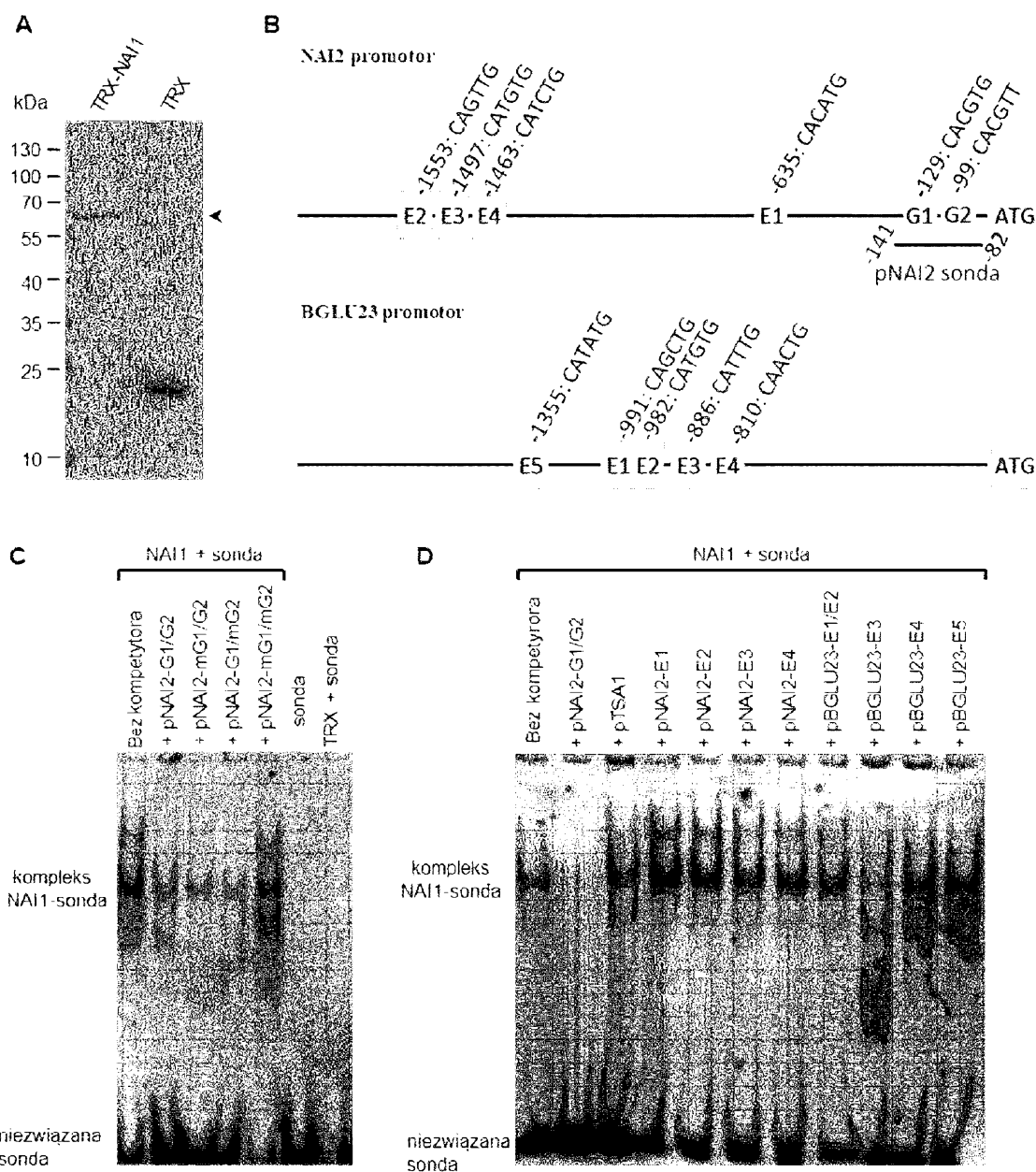


Fig. 1

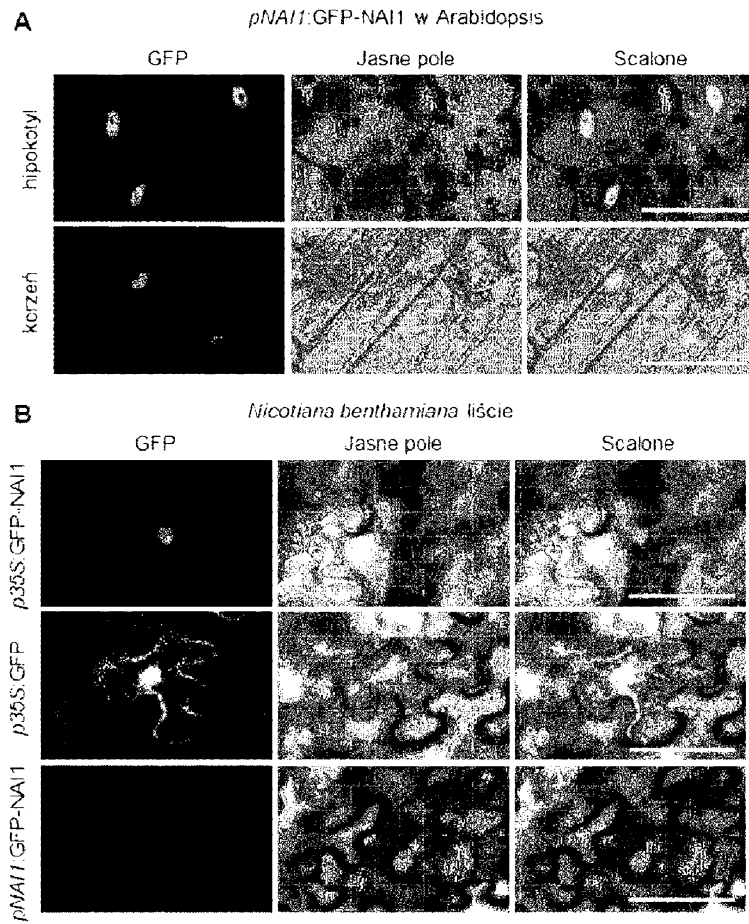


Fig. 2

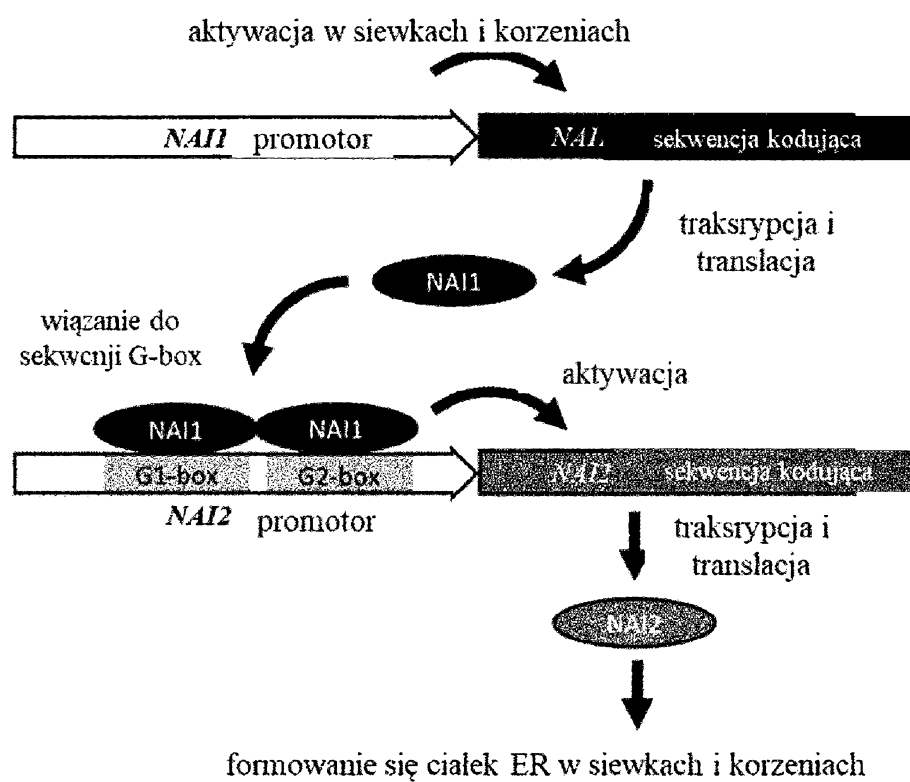


Fig. 3

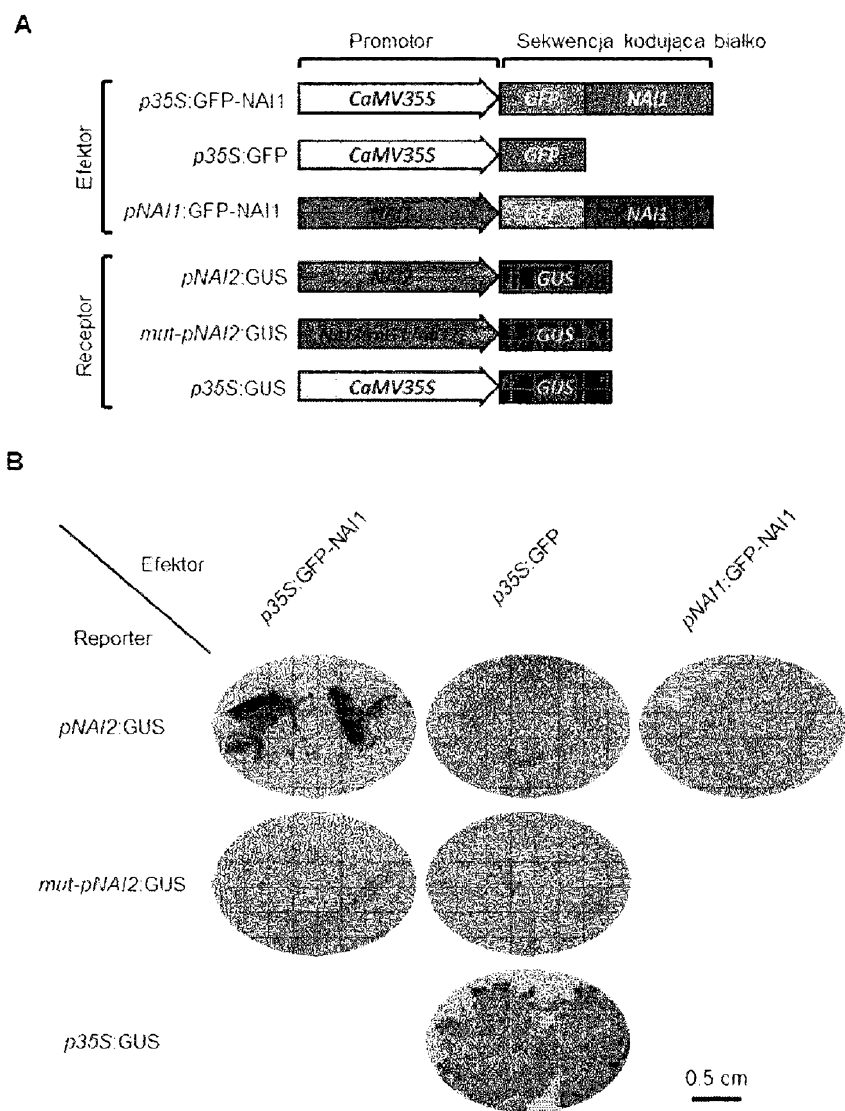


Fig. 4