

INDUKÁLHATÓ EXPRESSZIÓS RENDSZER NÖVÉNYEKBEN VALÓ ALKALMAZÁSRA

KIVONAT

A találmány mezőgazdaságilag elfogadható hidrolizálható észterek, például (I) általános képletű vegyületek, amelyekben R^1 és R^2 jelentése a bejelentésben meghatározott, alkalmazásával foglalkozik egy növényi gén expressziójának szabályozásában, ahol az említett szabályozásra egy aktiválást igénylő indukálható promóter hat és egy exogén vegyi anyag, amely valamely alkoholból állhat, jelenléte. Az említett mezőgazdaságilag elfogadható észter hidrolízise eredményezi az említett alkohol termelését. A találmány további tárgyai ezeknek az észtereknek a kiszerezései.

"A2"



Képviselő: Dr. Jalsovszky Györgyné ügyvéd

INDUKÁLHATÓ EXPRESSZIÓS RENDSZER
NÖVÉNYEKBEN VALÓ ALKALMAZÁSRA

SYNGENTA LIMITED Fernhurst, Haslemere, Surrey GU27 3JE,
Nagy-Britannia

Feltalálók:

CLARKE Eric Daniel

CHRYSTAL Ewan James Turner

JEPSON Ian

PAINE Jacqueline Ann Mary

Jealott's Hill Research Station, Bracknell, Berkshire RG42 6ET,
Nagy-Britannia

Bejelentés napja: 1999. 12. 22.

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/GB99/04348

A nemzetközi közzététel száma: WO 00/44917

Elsőbbsége: 1999. 02. 01. 9902234.5 GB



INDUKÁLHATÓ EXPRESSZIÓS RENDSZER NÖVÉNYEKBEN VALÓ ALKALMAZÁSRA

A találmány expressziós rendszerre vonatkozik növényekben való alkalmazásra, különösen olyan expressziós rendszerre, amely exogén kémiai szert hasznosít szabályozó mechanizmusként, vonatkozik továbbá bizonyos kémiai anyagok, mint említett szabályozó szerek alkalmazására.

A gén expressziót a fehérje kódoló területtől „felfelé” (5') (upstream) levő területek szabályozzák, amelyeket általában „promóter”-eknek neveznek. Egy promóter lehet konstitutív, szövetfajlagos, fejlődéssel programozható vagy indukálható.

A termény növények manipulálása a jellemzők (például termelékenység vagy minőség) javítása érdekében magában foglalja idegen vagy endogén gének expresszióját növényi szövetekben. Az ilyen genetikai manipuláció ennél fogva eszközök hozzáférhetőségére épül a gén expresszió szabályozására, ahogyan szükséges, így például olyan megfelelő promóterek hozzáférhetőségére és alkalmazására, amelyek hatékonyak növényekben. Előnyös sokféle különböző promóter széles választékával rendelkezni úgy, hogy a legalkalmasabb promótert választhassuk ki egy adott génhez, konstrukcióhoz, sejthez, szövethez, növényhez vagy környezethez. Promóterek széles tartományáról ismeretes, hogy működőképes növényekben.

Különösen alkalmasak bizonyos esetekben azok a promóterek, amelyek külső kémiai induktor alkalmazásával indukálhatók. Ez lehetővé teszi, hogy az adott gén expresszió a növény kinövésének vagy



fejlődésének megfelelő stádiumaiban szabályozható legyen egy kémiai anyag jelenlétével vagy távollétével, amely a növényekre vagy magokra alkalmazható például permetezéssel vagy más ismert mag beburkoló technikákkal. Ezeket úgy is ismerjük, mint gén „kapcsoló” promótereket.

A gén, amely indukálható promóter szabályozása alatt áll, lehet az a gén, amely létrehozza magának a fenotípusnak a kívánt jellemzőit, vagy az indukálható promóter szabályozhatja egy represszor fehérje expresszióját, amely gátolja egy cél gén expresszióját például kölcsönhatásba lépve egy operátor szekvenciával a cél géntől fölfelé, így megakadályozva a gén expresszióját (ahogyan ez például ismeretes a bakteriális tet és lac operátor/represszor rendszerekben). Egy másik alternatíva szerint az indukálható promóter szabályozása alatt álló gén olyan fehérjét expresszálhat, amely kölcsönhatásba lép egy másik fehérjével, hogy gátolja annak aktivitását, mint például a barnáz/barsztar rendszerben, ahol a barnáz gátolja vagy elpusztítja a sejteket barsztar távollétében.

Az ilyen típusú gén kapcsolók sokféle alkalmazásra ismeretesek. Ezek közt található a reverzibilis hímsterilitás kialakítás, amely vonás nagy mértékben kívánatos a hibrid növények kialakításában, ahogyan ez le van írva például a WO 90/08830 számú PCT közzétételi iratban. Az ilyen promóterek további alkalmazásai között található a csíraplazma védelem, ahol az adott terménynövények, elsősorban transzgenikus növények elszigetelése és a vadon termő növények szabályozása szükséges, és az idő előtti kicsírázás megakadályozása szükséges, ahogyan ez le van írva a WO 94/03619 számú PCT közzétételi iratban.

Több organizmusnak van olyan mechanizmusa, amely lehetővé teszi, hogy az organizmus metabolizálja a vegyi anyagokat, mint pél-



dául az alkoholokat vagy ketonokat alkohol dehidrogenáz enzim termelése révén. Ezen rendszerek promóterei hasznosak lehetnek génkapcsolásokban, amikor a promóterek indukálhatók lehetnek a cél alkohol vagy keton jelenléte révén.

Egy ilyen példát találhatunk egy *A. nidulans* gomba organizmusban, amely az *alcA* gén által kódolt alkohol dehidrogenáz I (ADH1) enzimet csak akkor expresszálja, amikor ez különböző alkoholok vagy ketonok jelenlétében növekszik. Az indukció egy, az *alcR* gén által kódolt szabályozó fehérje révén közvetítődik és konstitutívan expresszálódik. Az induktor (alkohol vagy keton) jelenlétében a szabályozó fehérje aktiválja az *alcA* gén expresszióját. A szabályozó fehérje stimulálja magát az expressziót induktor jelenlétében. Ez azt jelenti, hogy ADH1 enzim nagy szintjei termelődnek indukáló körülmények között (vagyis amikor alkohol vagy keton van jelen). Következésképpen az *alcA* gén és terméke, az ADH1, nem expresszálódik induktor távollétében. Az *alcA* expressziója és az enzim termelése is represszálódik glükóz jelenlétében.

Így az *alcA* gén promóter egy indukálható promóter, amelyet az *alcR* szabályozó fehérje aktivál egy induktor (vagyis a fehérje/alkohol vagy fehérje/keton kombináció) jelenlétében. Az *alcR* és *alcA* géneket (amelyekben a megfelelő promóterek benne foglalhatnak) klónozzuk és szekvenciájukat elemezzük [Lockington R. A. és munkatársai: *Gene* 33, 137-149 (1985); Felenbok B. és munkatársai: *Gene* 73 385-396 (1988); és Gwynne és munkatársai: *Gene* 51, 205-216 (1987)].

Az alkohol dehidrogenáz (*adh*) géneket vizsgálták bizonyos növény fajokban. A kukoricában és más gabonanövényekben ezek anaerob körülmények között kapcsolnak. Az *adh* gének kapcsoló területe a kukoricából tartalmaz egy 300 bp-s szabályozó elemet,



amely az anaerob körülmények közötti expresszióhoz szükséges. Nem találtak azonban ekvivalenst az alcR szabályozó fehérjével semmiféle növényben. Ezáltal az alcR/alcA típusú gén szabályozó rendszer nem ismeretes növényekben. Az alcR konstitutív expressziója növényi sejtekben nem eredményezi az endogén adh aktivitás aktiválását.

A WO 93/21334 számú PCT közzétételi irat leírja olyan transzgenikus növények kialakítását, amelyek magukban foglalnak ilyen rendszert gén kapcsolóként. Ez a dokumentum speciálisan leír egy kémiai indukálható növényi gén expressziós kazettát, amely tartalmaz egy első promótert operatíván hozzákapcsolva egy olyan szabályozó szekvenciához, amely egy szabályozó fehérjét kódol, és egy indukálható promótert, amely operatíván kapcsolódik egy cél génhez, ahol az indukálható promótert a szabályozó fehérje aktiválja egy hatékony exogén induktor jelenlétében, ezáltal az induktor alkalmazása a cél gén expresszióját idézi elő. Különösen az alcR/alcA rendszer hasznosítható ezekben a konstrukciókban. Exogén kémiai induktorokat, amelyek ebben az esetben alkalmazhatók, írnak le Creaser és munkatársai [J. Biochem. 225, 449-454 (1984)], köztük a butan-2-ont (etil-metil-keton), ciklohexanont, aktont, butan-2-olt, 3-oxo-vajsavat, propán-2-olt és etanolt.

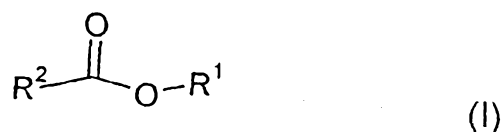
Mezőgazdasági célokra általában alkoholokat alkalmaznak exogén kémiai induktorként. Az ilyen kémiai anyagok azonban gyakran illékonyak és ezért nehéz kezelni ezeket mezőgazdasági vonatkozásban, mivel nagy mennyiségű vegyi anyag vész el a permetezés során.

A találmány biztosítja mezőgazdaságilag elfogadható hidrolizálható észterek alkalmazását növényi gének expressziójának szabályozásában, ahol az említett szabályozás valamely indukálható



promóter hatására, amely az aktiváláshoz szükséges, és valamely exogén kémiai anyag, amely alkoholt tartalmazhat, jelenlétére megy végbe, ahol az említett mezőgazdaságilag elfogadható észter hidrolízise az említett alkohol kialakulását eredményezi.

A mezőgazdaságilag különösen elfogadható észterek az olyan (I) általános képletű vegyületek,



ahol a képletben

R^1 jelentése kis szénatomszámú alkil-, kis szénatomszámú alkenil- vagy kis szénatomszámú alkinilcsoport; és

R^2 jelentése valamely szerves csoport úgy, hogy az R^2COOH valamely mezőgazdaságilag elfogadható sav. Az (I) általános képletű vegyületek hidrolízise (II) általános képletű alkoholokhoz vezet



A „mezőgazdaságilag elfogadható” kifejezés, ahogyan itt használjuk, azt jelenti, hogy a vegyületeket lehet alkalmazni egy adott talajhoz vagy terményhez anélkül, hogy a talajkárosodás elfogadhatatlan szintjeit okoznák, vagy a terményekben fitotoxicitást okoznának.

A „kis szénatomszámú alkil” kifejezés, ahogyan itt használjuk, magában foglalja az 1-6 szénatomos alkilcsoportokat, előnyösen az



1-4 szénatomszámú alkilcsoportokat, amelyek lehetnek egyenes- vagy elágazó szénláncúak. A „kis szénatomszámú alkenil” vagy „kis szénatomszámú alkinil” kifejezések, ahogyan itt használjuk, magukba foglalják a 2-6 szénatomos alkenil- illetve 2-6 szénatomos alkinilcsoportokat, előnyösen 2-4 szénatomos alkenil- és 2-4 szénatomos alkinilcsoportokat, amelyek lehetnek egyenes- vagy elágazó szénláncúak.

A mezőgazdaságilag elfogadható észterek, például az (I) általános képletű észterek a találmány szerinti felhasználásban megfelelően át vannak helyezve a cél növénybe, amelyben a gén szabályozó rendszer helyben van, és/vagy hidrolizálódnak vagy környezeti körülmények között, vagy valamely alkalmas katalitikus rész, például enzim vagy katalitikus antitest jelenlétében olyan sebességgel, amely alkalmas arra, hogy az aktiváló alkohol elegendő mennyisége keletkezzék a megfelelő időpontban a növény szükséges részében. Ezek a tényezők változhatnak a kezelendő növényfaj természetétől, az expresszálandó géntől és az észter alkalmazásának ütemezésétől függően.

Az észterek, például az (I) általános képletű észterek annyiban előnyösek, hogy könnyebb kezelni ezeket, mint a megfelelő alkoholoikat. Arra jöttünk rá, hogy ezek a vegyületek képesek kialakítani a kívánt hatást a gén aktiválás szempontjából.

A vegyületeket alkalmazhatjuk megfelelő időtartamnál a kívánt gén aktiválás előtt, hogy lehetővé váljék a hidrolízis véghezvitele, és ennek ésszerűen függnie kell olyan tényezőktől, mint például a növény növekedési stádiuma, amelynél az aktiválás szükséges. Ha a hidrolízis sebessége viszonylag lassú, az alkalmazás időpontja lehet korábbi annak biztosítására, hogy a megfelelő hidrolízis végbemen-



jen addig az időpontig, amikor a növény annál a növekedési stádiumnál van, amelynél a gén aktiválás szükséges. Amikor ez nehézkes, ki lehet választani gyorsabban hidrolizáló észtereket.

Egy másik megoldás szerint egynél több észter eltérő hidrolizáló sebességekkel alkalmazható egy egyedi kezeléshez. A különböző hidrolízis sebességű észterek kombinációinak kiválasztásával egy aktiváló alkohol hatékony „lassú kibocsátása” érhető el úgy, hogy a gén expresszió meghosszabbítható egy kívánt időtartamon át. Ez azt jelenti, hogy egy kémiai anyag ismételt alkalmazásait el lehet kerülni és így „egy-lövéses” kezelések válnak lehetővé.

A (II) általános képletű alkoholokra példák lehetnek a metanol, etanol, propan-1-ol, propan-2-ol, butan-2-ol és but-3-en-2-ol.

A (II) általános képletű alkoholok elsősorban olyan kis szénatomszámú alkoholok, ahol az alkilcsoport 1-4 szénatommal bír és lehet elágazó szénláncú vagy lineáris. Az előnyös csoportok R^1 -re magukban foglalják az etil-, n-propil- és n-butilcsoportokat.

Különösen előnyös példa a (II) általános képletű vegyületekre az etanol.

Az R^2 pontos természetete csaknem lényegtelen, feltéve, hogy ez egy mezőgazdaságilag elfogadható savat hoz létre megfelelő sebességgel egy adott cél növényben, amelyhez ezt alkalmazzuk. A hidrolízis sebességét rutin eljárásokkal határozhatjuk meg, például olyanokkal, amelyeket Mitchell G. és munkatársai írnak le [Pestic. Sci. 44, 49-58 (1995)], előnyösen vizsgálva a teljes növényi rendszeren keresztül. Az, hogy mi tekinthető megfelelőnek egy adott esetben, sokféle tényezőtől függ, ide értve a szabályozandó gén expresszió természetét, az adott növényt, amelyben a gén expresszálódik, és más külső feltételeket. A hidrolízis sebességének



olyannak kell lennie, hogy lehetővé tegye a kívánt hatást, például a reverzibilis hímsterilitás a kémiai induktor alkalmazása után megfelelő időpontban észlelhető legyen.

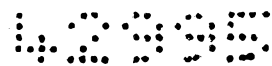
Az R^2 -t azonban úgy kell kiválasztani, hogy a létrejövő (III) általános képletű savnak



legyen bizonyos hasznos mezőgazdasági hatása. Ez elsősorban az lehet, hogy ez maga az indukálható promóter induktoraként tevékenykedhessen. Így például arra jöttek rá, hogy sokféle sav, ideértve a 3-hidroxi-vajsavat, 2-hidroxi-vajsavat, piroszölősavat és 3-oxi-vajsavat, tevékenykedhet az alcR/alcA rendszer induktoraként (lásd Creaser és munkatársai előzőekben idézett munkáját).

Az R^2 -re megadható példák között található a kívánt esetben helyettesített alkil-, kívánt esetben helyettesített cikloalkil-, kívánt esetben helyettesített alkenil-, kívánt esetben helyettesített alkinil-, kívánt esetben helyettesített aril- és kívánt esetben helyettesített heterociklilcsoportok.

Ahogy itt használjuk, az „alkil” kifejezés magában foglal egyenes- vagy elágazó szénláncú alkilcsoportokat, amelyek maximum 10 szénatomot, előnyösen 1-6 szénatomot tartalmaznak. Az „alkenil” és „alkinil” kifejezések telítetlen egyenes- vagy elágazó szénláncokat



foglalnak magukban, amelyek maximum 10, előnyösen 2-6 szénatomot tartalmaznak. Az „aril” kifejezés magában foglalja a fenil- vagy naftilcsoportokat. A „heterociklus” kifejezés magában foglal maximum 10, előnyösen maximum 7 atomos gyűrűket, amely gyűrűtagok közül maximum 3 oxigén-, kén- vagy nitrogénatom található. Ezek a gyűrűk lehetnek egyedi gyűrűk vagy lehetnek fuzionált gyűrűrendszerek, és ezek lehetnek aromás vagy nem aromás természetűek. A „halogén” kifejezés magában foglalja a klór-, fluor-, bróm- és jódatomokat. Az „alkoxi” kifejezés az előzőekben meghatározott alkilcsoportra utal, amely egy oxigénatomon keresztül kapcsolódik.

Megfelelő R^2 csoport egy kívánt esetben helyettesített 1-10 szénatomos alkilcsoport, amely lehet lineáris vagy elágazó szénláncú. Az előnyös R^2 alkilcsoportok lineárisak és 3-8 szénatomot, elsősorban 5 szénatomot tartalmaznak.

Az alkil-, alkenil- és alkinil- R^2 csoportok kívánt esetben jelenlevő egy vagy több szubsztituense között található a halogénatomok, továbbá a nitro-, ciano-, oxo-, kívánt esetben helyettesített aril-, kívánt esetben helyettesített heterociklil-, OR^3 -, $C(O)_pR^3$ -, $S(O)_mR^3$ -, $OCOR^3$ -, $-NR^4C(O)_pR^3$ -, $=NOH$ -, NR^5R^6 -, $C(O)NR^5R^6$ -, $C(O)NR^3NR^5R^6$ -, $-CH=NOR^3$ -, $P(O)R^7R^8$ - vagy $P(O)OR^7OR^8$ -, $NR^3CONR^5R^6$ -, $-N=CR^5R^6$ -, $S(O)_mNR^5R^6$ -, $-NR^3S(O)_mR^4$ - és $-N=NR^3$ -csoportok ahol R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 és R^8 jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom vagy alkil-, alkenil-, aril-, vagy heterociklilcsoport, amelyek bármelyike kívánt esetben helyettesítve lehet egy funkciós csoporttal, és aril- és heterociklusos csoportok esetében helyettesítve lehet alkil-, alkenil- vagy alkinilcsoportokkal is; vagy R^5 és R^6 együtt azzal az atommal, amelyhez rögzítve vannak, gyűrűt

képezhetnek, amely lehet karbociklusos és heterociklusos; p értéke 1 vagy 2, és m értéke 0, 1, 2 vagy 3.

Ahogy itt használjuk, a „funkciós csoport” kifejezés magában foglal halogénatomokat, továbbá ciano-, nitro-, oxo-, hidrox-, $=\text{NOR}^{11}$ -, $\text{C}(\text{O})_p\text{R}^{11}$ -, OR^{11} -, $\text{S}(\text{O})_m\text{R}^{11}$ -, $\text{NR}^{12}\text{R}^{13}$ -, $\text{C}(\text{O})\text{NR}^{12}\text{R}^{13}$ -, $\text{OC}(\text{O})\text{NR}^{12}\text{R}^{13}$ -, $-\text{CH}=\text{NOR}^{11}$ -, $-\text{NR}^{12}\text{C}(\text{O})_n\text{R}^{11}$ -, $-\text{NR}^{11}\text{CONR}^{12}\text{R}^{13}$ -, $-\text{N}=\text{CR}^{12}-\text{R}^{13}$ -, $\text{S}(\text{O})_m\text{NR}^{12}\text{R}^{13}$ - vagy $-\text{NR}^{12}\text{S}(\text{O})_m\text{R}^{11}$ -csoportokat, ahol R^{11} , R^{12} és R^{13} jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom vagy kívánt esetben helyettesített hidrokarboncsoport, vagy R^{12} és R^{13} együtt azzal az atommal, amelyhez rögzítve vannak, kívánt esetben helyettesített gyűrűt képeznek, amely kívánt esetben tartalmazhat további heteroatomokat is, például oxigén- vagy nitrogénatomot vagy $\text{S}(\text{O})\text{R}^{14}$ -csoportot; p értéke egész szám, mégpedig 1 vagy 2, m értéke egész szám, mégpedig 0, 1, 2 vagy 3, és R^{14} jelentése hidrogénatom vagy alkilcsoport.

Az R^{11} , R^{12} vagy R^{13} hidrokarbon csoportokhoz kívánt esetben társuló megfelelő helyettesítők magukban foglalják a halogénatomokat, továbbá a perhalogén-alkil (például trifluor-metil)-, merkaptó-, hidrox-, alkoxi-, oxo-, heteroaril-oxi-, alkenil-oxi-, alkinil-oxi-, alkoxi-alkoxi-, aril-oxi (ahol az arilcsoport kívánt esetben helyettesítve lehet halogénatommal vagy nitro- vagy hidroxicsoporthal)-, ciano-, nitro-, amino-, mono- vagy dialkil-amino-, alkil-amido- vagy $\text{S}(\text{O})_p\text{R}^{14}$ -csoportokat, ahol m értéke, illetve R^{14} jelentése az előzőekben meghatározott.

Az R^2 alkil-, alkenil- vagy alkinilcsoportok kívánt esetben jelen levő szubsztituenseire példák lehetnek a halogénatomok, mint a klór-, fluor- vagy brómatomok; továbbá az oxocsoport; alkoxi-karbonil (különösen kis szénatomszámú alkoxi-karbonil) – csoport; cianocsoport; kívánt esetben amino- vagy mono- vagy dialkil-amino- vagy alkil

(például metil)- csoporttal helyettesített fenilcsoport; OR^3 csoport, amelyben R^3 jelentése alkil- vagy heterociklilcsoport kívánt esetben halogénatommal vagy alkilcsoporttal helyettesítve; $S(O)_m R^{11}$ -csoport, amelyben m értéke 0 vagy 2, és R^{11} jelentése alkilcsoport vagy kívánt esetben alkilcsoporttal helyettesített fenilcsoport; NR^5R^6 -vagy $C(O)NR^5R^6$ -csoport, ahol R^5 jelentése hidrogénatom vagy metil- vagy metoxi-etilcsoport és R^6 jelentése alkil (például metil)-, fenil- vagy benzilcsoport kívánt esetben helyettesítve halogénatommal, például fluor- vagy klóratommal, vagy alkilcsoporttal, például metilcsoporttal, trifluor-metilcsoporttal vagy alkoxi-karbonilcsoporttal, ahol az alkil rész hordozhat egy további alkoxi-karbonilcsoportot, vagy R^6 jelentése heterociklil (például tiazinil)-csoport kívánt esetben alkil- és/vagy acetilcsoporttal helyettesítve; $-NR^4C(O)_pR^3$ -csoport, ahol p értéke 2, R^3 jelentése alkilcsoport és R^4 jelentése kívánt esetben alkoxi-karbonilcsoporttal helyettesített alkilcsoport (például etoxi-karbonil-alkilcsoport); $-NR^3S(O)_mR^4$ -csoport, ahol R^3 jelentése hidrogénatom, R^4 jelentése kívánt esetben halogénatommal, például klóratommal helyettesített fenilcsoport, és m értéke 2; $C(O)NR^3NR^5R^6$ -csoport, ahol R^3 és R^5 jelentése hidrogénatom és R^6 jelentése kívánt esetben halogén, például klóratommal vagy alkoxicssoporttal, például metoxicssoporttal helyettesített fenilcsoport; $S(O)_mNR^5R^6$ -csoport, ahol m értéke 2, R^5 jelentése hidrogénatom és R^6 jelentése kívánt esetben egy vagy több alkoxi-karbonilcsoporttal helyettesített alkilcsoport; heterociklilcsoport, például furil-, piridil-, piridinil-, pirazinil- vagy triazinilcsoport, amelyek bármelyike kívánt esetben helyettesítve lehet halogénatommal vagy alkil-, trihalogén-metil-, fenil-, halogén-fenil-, ciano- vagy oxocsoporttal.

Különösen előnyös helyettesítói az R^2 alkil- alkenil- vagy alkinilcsoportjainak az alkoxi-karbonilcsoport, amelyben az alkoxicsso-

port kis szénatomszámú alkoxicsoport; az alkoxicsoport, és különösen két alkoxicsoport dialkil-acetál formájában; cianocsoport; vagy kívánt esetben helyettesített heterociklilcsoport. Az előnyös helyettesítők magukban foglalják, a korlátozás szándéka nélkül, a kis szénatomszámú alkoxi-karbonilcsoportokat és dialkil-acetálokat. Az alkoxi-karbonilcsoportok és a dialkil-acetálok különösen akkor érdekesek, amikor a helyettesítő alkilcsoportja azonos az R^1 -gyel az (I) általános képletű vegyületben, mivel hidrolíziskor ezzel több (II) általános képletű induktor vegyi anyag szabadul fel.

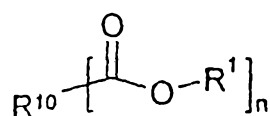
Az R^2 előnyös arilcsoportja fenilcsoport.

Az R^2 cikloalkil-, aril- és heterociklilcsoportok kívánt esetben jelen levő szubsztituenseire, továbbá az R^2 korábban említett alkil-, alkenil-, vagy alkinilcsoportjain jelen levő aril- vagy heterociklilcsoportok szubsztituenseire példák lehetnek a halogénatomok; továbbá a halogén-alkilcsoportok; cianocsoport, nitrocsoport; amino- vagy mono- vagy dialkil-aminocsoportok; hidroxicsoport; alkoxi- és tioalkil-, alkil-, vagy alkil-oxi-karbonilcsoport, ahol ezen csoportok bármelyikének alkil része kívánt esetben helyettesítve van egy vagy több halogénatommal vagy alkoxi-, ciano-, alkoxi-karbonil-, amino-, mono- vagy dialkil-amino-, aril-, vagy karboxilátcsoporthal vagy ezek sóival vagy észtereivel; cikloalkilcsoporttal vagy heterociklilcsoporttal.

Különösen alkalmas helyettesítők R^2 aril- vagy heterociklilcsoportokhoz az alkoxicsoportok, elsősorban a kis szénatomszámú alkoxicsoportok, például metoxicsoport, az alkilcsoportok, elsősorban a kis szénatomszámú alkilcsoportok, az alkoxi-karbonilcsoportok, elsősorban a kis szénatomszámú alkoxi-karbonilcsoportok, és a halogénatomok.



Az (I) általános képletű vegyületek egy adott csoportját képezik az (IA) általános képletű vegyületek



(IA)

ahol a képletben R^1 jelentése az (I) általános képletnél az előzőekben megadott, n értéke egész szám 2-től 4-ig, és R^{10} jelentése alkil-, alkenil-, vagy alkinilcsoport, amelyek bármelyikébe kívánt esetben heteroatom lehet beékelve, cikloalkil-, heterociklil- vagy arilcsoport, vagy R^{10} jelentése n vegyértékű cikloalkil- vagy arilcsoport.

Az R^{10} jelentése elsősorban n vegyértékű alkil- vagy arilcsoport.

Különösen előnyös (I) általános képletű vegyületek például: etil-2-n-pentil-3-oxo-butanoát (49. vegyület); trietil-2-karboxi-heptán-1,7-dioát (53. vegyület); és etil-2,4-dimetoxi-benzoát (60. vegyület).

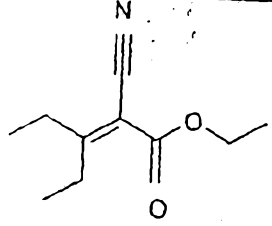
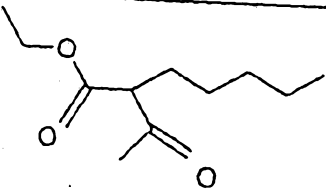
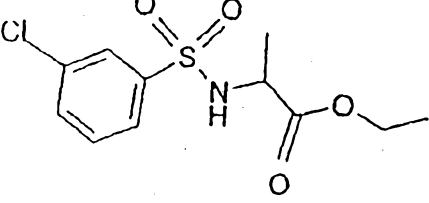
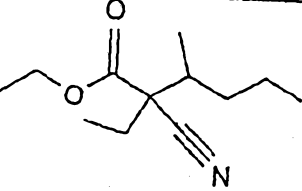
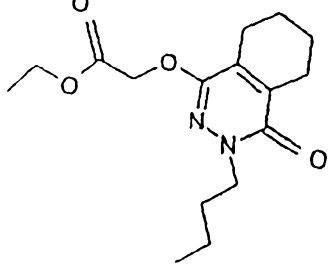
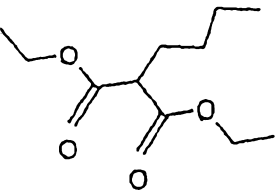
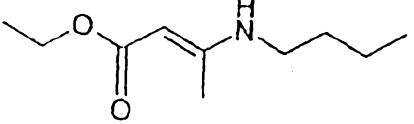
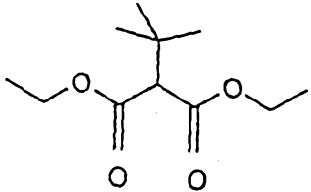
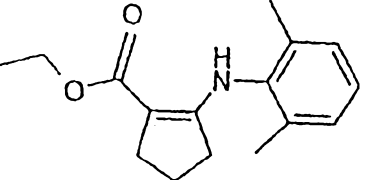
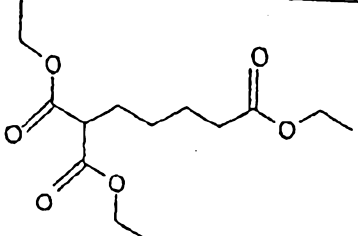
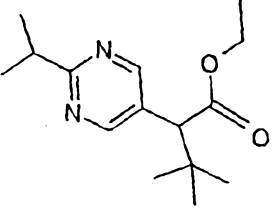
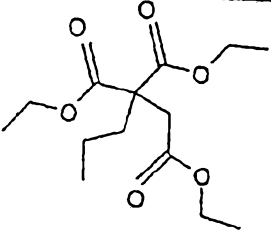
Az (I) általános képletű vegyületek példái etilészterek, ahogyan ezt az 1. táblázatban bemutatjuk.

1. TÁBLÁZAT


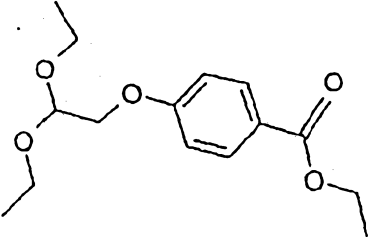
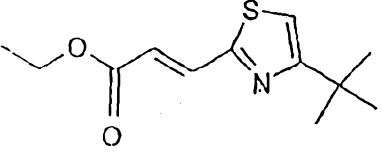
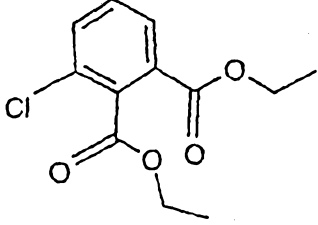
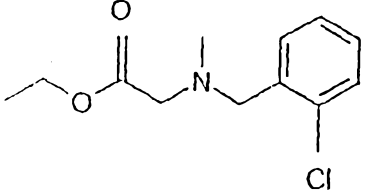
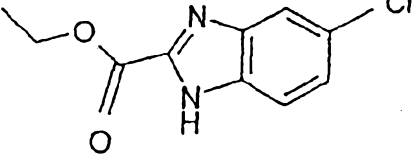
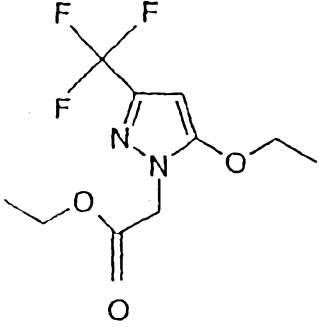
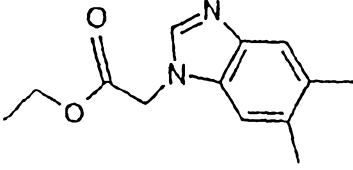
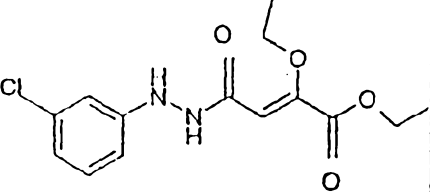
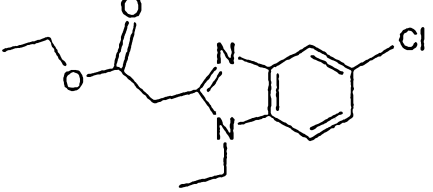
| Vegyület száma | Képlet | Vegyület száma | Képlet |
|----------------|--------|----------------|--------|
| 1 | | 34 | |

| | | | |
|---|--|----|--|
| 2 | | 35 | |
| 3 | | 36 | |
| 4 | | 37 | |
| 5 | | 38 | |
| 6 | | 39 | |
| 7 | | 40 | |
| 8 | | 41 | |
| 9 | | 42 | |

| | | | |
|----|--|----|--|
| 10 | | 43 | |
| 11 | | 44 | |
| 12 | | 45 | |
| 13 | | 46 | |
| 14 | | 47 | |
| 15 | | 48 | |

| | | | |
|----|---|----|--|
| 16 |  | 49 |  |
| 17 |  | 50 |  |
| 18 |  | 51 |  |
| 19 |  | 52 |  |
| 20 |  | 53 |  |
| 21 |  | 54 |  |

| | | | |
|----|--|----|--|
| 22 | | 55 | |
| 23 | | 56 | |
| 24 | | 57 | |
| 25 | | 58 | |
| 26 | | 59 | |
| 27 | | 60 | |
| 28 | | 61 | |

| | | | |
|----|--|----|--|
| 29 |  | 62 |  |
| 30 |  <p data-bbox="432 629 568 667">E forma</p> | 63 |  |
| 31 |  | 64 |  |
| 32 |  | 65 |  |
| 33 |  | 66 |  |



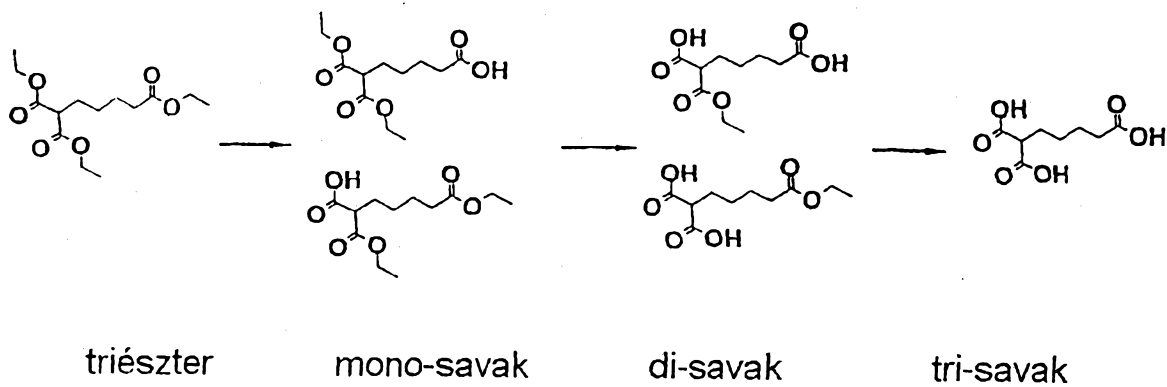
Az (I) általános képletű vegyületek vagy ismert vegyületek, vagy ismert vegyületekből állíthatók elő hagyományos eljárásokkal.

Az (I) általános képletű vegyületek hidrolizálhatók a cél növényben vagy kémiai úton, vagy enzimesen egy, a cél növényben természetben előforduló enzim révén, vagy egy olyan enzim révén, amely genetikai manipuláció révén lett bevezetve a növénybe és expresszáldott a növényen belül, vagy egy alkalmas katalitikus antitest vagy egy katalitikus antitest katalitikusan aktív része révén, amelyek genetikai manipulációval vannak bevezetve a növénybe és expresszáldnak a növényen belül.

Az alkalmas enzimek között elsősorban megemlítjük, a korlátozás szándéka nélkül, az észterázokat és lipázokat.

A megfelelő katalitikus antitestek standard technikákkal alakíthatók ki egy tetraédes észter hidrolízis átmeneti állapot analógiáiból, mint például a klóramfenikol előgyógyszerének észter hidrolízisénél, amikor megfelelő foszfonátokat alkalmaznak [Ole K. és munkatársai: *J. Mol. Biol.* 281, 501-511 (1998)], vagy kokain detoxikálásához alkalmaznak metil észter hidrolízissel [Mets B. és munkatársai: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95, 10176-10181 (1998)].

A találmány szerinti vegyületek metabolizmusát tovább vizsgáljuk és ezeknek a vizsgálatoknak az eredményeit az ez után következő kiviteli példákban ismertetjük. A nélkül, hogy valamely mechanikus megfontolásra korlátoznánk, úgy véljük, hogy például ez egyik reprezentatív találmány szerinti vegyület, az 53. vegyület, az alábbi reakcióvázlattal összhangban metabolizálódik:



Ennek a metabolizmusnak a terméke az etanol, amely kémiai induktorként működhet, amint ezt az előzőekben ismertettük.

Egy további szempontja szerint a találmány eljárást nyújt egy cél gén expressziójának szabályozásához valamely növényben, ahol az említett növény valamely kémiaailag indukálható növényi gén expressziós kazettával van transzformálva; ez a kazetta tartalmaz egy első promótert működőképesen összekapcsolva egy szabályozó szekvenciával, amely egy szabályozó fehérjét kódol, és tartalmaz egy indukálható promótert működőképesen összekapcsolva egy cél génnel, ahol az indukálható promóter a szabályozó fehérjével aktiválódik valamely alkohol, például az előzőekben meghatározott (II) általános képletű valamely vegyület jelenlétében; az említett eljárás magában foglalja egy olyan észter alkalmazását az említett növényhez, amely hidrolizál kialakítva az említett alkoholt; ilyen például valamely, az előzőekben meghatározott (I) általános képletű vegyület, így létrejön a cél gén expressziója.

A megfelelő szabályozó szekvencia az alcR fehérjét kódolja, ahogyan az előzőekben leírtuk, és az indukálható promóter az alcA promóter szekvencia.



Ahol szükséges vagy kívánatos, a növényeket transzformálhatjuk úgy, hogy az expresszájon vagy túlexpresszájon valamely enzimet vagy katalitikus antitestet vagy ennek katalitikusan aktív fragmentumát, amely hidrolizálja az (I) általános képletű vegyületet (II) általános képletű vegyületet alakítva ki.

Az olyan enzimek, amelyek inaktívak promóterek vagy más részek távollétében, amelyeket a növényekbe kell manipulálni, előnyök lehetnek bizonyos körülmények között, mivel ezek csak a cél transzformált magban hatékonyak.

A nukleinsav szekvenciák, amelyek a hidrolitikus enzimet, antitestet vagy antitest fragmentumot kódolják, belefoglalhatók egy olyan konstrukcióba, amely tartalmazza a szabályozó fehérjét és/vagy a cél gént működőképesen hozzákapcsolva az indukálható promóterhez, vagy ezek egy külön konstrukcióban lehetnek jelen, amelyeket a növény együtt-transzformálására használunk fel. Az ilyen rendszerek azonban újak.

Így a találmány egy további szempontja szerint növényi gén expressziós rendszert biztosít, amely tartalmaz

(i) egy első promótert működőképesen hozzákapcsolva egy szabályozó szekvenciához, amely egy szabályozó fehérjét kódol;

(ii) egy indukálható promótert működőképesen hozzákapcsolva egy cél génhez, ahol az indukálható promóter a szabályozó fehérje révén van szabályozva egy előzőekben meghatározott (I) általános képletű hatékony exogén induktor jelenlétében, amely által az induktor alkalmazása a cél gén expresszióját idézi elő; és

(iii) egy szekvenciát, amely egy fehérjét kódol, ahol ez a fehérje hatással van egy észter, például egy (I) általános képletű vegyület hidrolízisére a megfelelő alkohollá egy további promóter szabályozása alatt, amely lehetővé teszi ennek expresszióját növényi szövetben.



A cél gén tartalmazhat bármely gént, amelyet szükséges egy növénybe bevezetni, hogy módosítsa annak jellemzőit, ahogyan az előzőekben körvonalaztuk. A cél gén lehet egy endogén növényi gén vagy egy külső gén, és lehet egy egyedi gén vagy gének sorozata. A cél gén szekvencia kódolja egy funkcionális fehérje legalább egy részét vagy egy antiszensz szekvenciát.

Bármely transzformációs eljárás, amely alkalmas a cél növényhez vagy növényi sejtekhez, alkalmazható, ide értve a fertőzést rekombináns Ti plazmidokat tartalmazó *Agrobacterium tumefaciens*-sel, az elektroporációt, sejtek és protoplasztok mikroinjektálását, a mikrobombázásos transzformálást és a pollencső transzformálást. A transzformált sejteket azután adott esetekben regenerálni lehet teljes növényekké, amelyekben az új mag anyag stabilan be van építve a genomba. Mind transzformált egyszikű, mind transzformált kétszikű növények nyerhetők ezen az úton.

A genetikailag módosított növények, amelyek kialakíthatók, magukban foglalják a szántóföldi növényeket, gabonaféléket, gyümölcsöket és zöldségeket, például kanolát, napraforgót, dohányt, cukorrépat, gyapotot, szóját, kukoricát, búzát, árpát, rizst, cirokot, paradicsomot, mangót, őszibarackot, almát, körtét, epret, banánt, dinnyét, burgonyát, répat, salátát, káposztát és hagymát.

A találmány továbbá növényi sejteket nyújt, amelyek egy találmány szerinti gén expressziós rendszert tartalmaznak. A gén expressziós rendszer transzformációval stabilan be lehet építve a növény genomjába. A találmány továbbá növényi szövetet vagy növényt nyújt, amely ilyen sejteket tartalmaz, nyújtja továbbá az ebből származó növényeket vagy magokat.

Az ebben az eljárásban alkalmazott (I) általános képletű vegyületekre előnyös példák azok, amelyeket az előzőekben leírtunk.



A találmány szerinti mezőgazdaságilag elfogadható észtereket, például (I) általános képletű vegyületeket megfelelően alkalmazzuk mezőgazdaságilag elfogadható kompozíció formájában valamely hígítóval vagy hordozóval kombinálva. Az ilyen kompozíciók a találmány egy további szempontját képezik.

A mezőgazdaságilag elfogadható észterek koncentrációja a kiszerezésben előnyösen mintegy 5 % (tömeg/tömeg) koncentráció vagy kevesebb. Előnyös a mintegy 2 % (tömeg/tömeg) és mintegy 5 % (tömeg/tömeg) közti koncentráció.

A megfelelő hordozók vagy hígítók nyilvánvalóak azok számára, akik a szakterületen járatosak, és különbözőek lehetnek az alkalmazott (I) általános képletű vegyületek természetétől függően. Így például ahol az (I) általános képletű vegyület valamely olaj, ez igényelheti valamely emulgeáló anyag jelenlétét abból a célból, hogy lehetőség legyen ennek permetezésére vizes oldatban. Az emulgeáló szerek jól ismertek a szakterületen, jó példa ezekre egy részben hidrolizált polivinilacetát (PVA) vagy Tween.

Szerves oldószerek vagy hígítók, például aceton, szintén lehetnek jelen.

Így egy előnyös kompozíció tartalmaz egy mezőgazdaságilag elfogadható észtert, például valamely (I) általános képletű vegyületet, valamely emulgeáló szert, például PVA-t, és valamely hígítót, például vizet. Az alkotórészek relatív mennyiségét nagy mértékben meghatározza a különböző alkotórészek kölcsönös keverhetősége. Az emulgeáló anyag alkalmasan azonban a kompozícióban 1-5 % (tömeg/tömeg), előnyösen mintegy 2,5 % (tömeg/tömeg) koncentrációban van jelen.

A találmány szerinti kiszerezésre példák lehetnek az alábbiak:



1. készítés

1,5 % találmány szerinti vegyület (például 53. vegyület);

2,5 % PVA;

a további rész víz.

2. készítés

1,5 % találmány szerinti vegyület (például 53. vegyület);

5 % aceton;

0,05 % Tween-20;

a további rész víz.

3. készítés

3,0 % találmány szerinti vegyület (például 53. vegyület);

2,5 % PVA;

a további rész víz.

4. készítés

3,0 % találmány szerinti vegyület (például 53. vegyület);

5 % aceton/H₂O;

0,05 % Tween-20;

a további rész víz.

Alternatív kompozíciók, amelyek alkalmazhatók, hasonlóak ahhoz, amelyek le vannak írva a jelen feltalálók függőben levő, 9902236.0 számú brit szabadalmi bejelentésében. Ezek a kompozíciók elsősorban az alábbiakat tartalmazzák:

- (a) valamely mezőgazdaságilag elfogadható észter, például
(i) általános képletű vegyület;
- (b) egy polietoxilezett 10-20 szénatomos alkohol vagy egy trisziloxán-polietoxilát; és



(c) valamely hígító.

A (c) hígító alkotórész lehet például víz.

Az előzőekben leírt készírelés (b) alkotórésze előnyösen egy polietoxilezett oleil-, lauril-, sztearil- vagy cetil-alkohol. Előnyösebb egy olyan polioxietilén-oleil-alkohol, amelynek átlagos moláris etilén-oxid tartalma a 0 és 35 közti tartományban, még előnyösebben a 2 és 20 közti tartományban van. A legelőnyösebbek egy polioxietilén-(2)-oleil-alkohol, egy polioxietilén-(10)-oleil-alkohol és egy polioxietilén-(20)-oleil-alkohol. A (b) alkotórész azonban mindenképp egy polioxietilén-(20)-oleil-alkohol (a zárójelben levő szám jelzi az átlagos etilén-oxid tartalmat molekulánként). Az ilyen termékek kereskedelmi forgalomban kaphatók például BRIJ 92, BRIJ 97 és BRIJ 98 néven.

A készírelés (b) alkotórésze előnyösen mintegy 0,5 % (tömeg/tömeg) vagy kisebb koncentrációban van jelen. Előnyösen a (b) alkotórész mintegy 0,2 % (tömeg/tömeg) és mintegy 0,5 % (tömeg/tömeg) közti koncentrációban van jelen.

Egy alternatív kiviteli formában a készírelés (b) alkotórészként egy hidrogén- vagy metil-végződésű trisziloxán-polietoxilátot foglal magában. A (b) alkotórész elsősorban metil-végződésű trisziloxán-polietoxilát. A metil-végződésű trisziloxán-polietoxilát előnyösen molekulánként 4 és 12 közti, előnyösen 8 átlagos moláris etilén-oxid tartalommal bír. Az ilyen termékek kereskedelmi forgalomban kaphatók SILWET 77 néven (a SILWET a Witco cég márkaneve).

A metil-végződésű trisziloxán-polietoxilát előnyösen mintegy 0,5 % (tömeg/tömeg) vagy kisebb koncentrációban van jelen. A koncentráció előnyösen a mintegy 0,2 % (tömeg/tömeg) és mintegy 0,5 % (tömeg/tömeg) között van.

A készírelés (c) alkotórésze előnyösen mintegy 90 % (tömeg/tömeg) és mintegy 98 % (tömeg/tömeg) között van jelen.



A további adalékanyagok, amelyek a készítésben jelen lehetnek, között található diszpergáló anyagok, antibakteriális vegyületek, nedvesítő anyagok; és bepárlódás elleni anyagok is hozzáadhatók a készítéshez.

A találmányt a továbbiakban kiviteli példákkal szemléltetjük részletesebben.

1. példa

Kémiai anyagok vizsgálata talajon nőtt növényeken

Egy előzetes átvizsgálást követően talaj nélküli oldaton a vegyületeket felhasználjuk olyan vizsgálatban, amelyet 4 hetes alc CAT homozigóta dohány vonal 30 növényén hajtunk végre ~ 4 cm-s (~ 1¹/₂) cserepecskében üvegházban. Levélmintákat veszünk a növényekből, mint „nem indukált” kontrollból. A levéldarabkákat megőröljük 200 µl 250 mmól/literes triszben (pH 8,0), centrifugáljuk és a felülúszót kiemeljük és 4°C hőmérsékleten tároljuk egy éjszakán át. A vegyületet feloldjuk 50 % acetón - 50 % dH₂O keverékben 0,05 % Tween-20-szal együtt, 200 mg/ml-es oldatot képezve. Ezt azután felhígítjuk 1/10 arányban 2 %-os oldattá, hacsak másképpen nem jelezzük, 5 ml oldatot alkalmazunk a 2 növény mindegyikének talajába, mint replika kezeléseket gyökéröntözéssel. 22 óra és 44 óra múlva levélmintákat veszünk, extraháljuk úgy, ahogyan az előzőekben leírtuk, és a felülúszókat 4°C hőmérsékleten tároljuk. A mintákat CAT fehérjére elemezzük mennyiségileg a Boehringer Mannheim cég CAT ELISA készletét alkalmazva, míg a teljes fehérje szintet Bradford meghatározással határozzuk meg. Az eredményeket a 2. táblázatban mutatjuk be, ahol az 1. CAT érték 0-5000 ng/g érték, a 2. érték az 50001-10000 ng/g érték, a 3. érték a 100001-15000 ng/g érték kimutatásának felel meg.

2. TÁBLÁZAT

| | Vegyület száma | CAT pontérték | | |
|----------|----------------|---------------|--------|--------|
| | | 0 óra | 22 óra | 44 óra |
| | | | | |
| | 1 | 0 | 1 | 0 |
| (2,5 ml) | 2 | 0 | 1 | 0 |
| | 3 | 0 | 1 | 2 |
| (2,5 ml) | 4 | 0 | 0 | 1 |
| | 5 | 0 | 0 | 3 |
| | 8 | 1 | 1 | 1 |
| | 9 | 1 | 0 | 2 |
| | 10 | 2 | 0 | 1 |
| | 12 | 1 | 0 | 2 |
| | 13 | 0 | 0 | 0 |
| | 14 | 0 | 1 | 0 |
| | 15 | 0 | 1 | 1 |
| | 16 | 1 | 1 | 6 |
| | 17 | 1 | 2 | 1 |
| | 18 | 0 | 1 | 1 |
| | 19 | 0 | 1 | 1 |
| | 20 | 0 | 0 | 1 |
| | 21 | 0 | 0 | 1 |
| | 22 | 0 | 0 | 1 |
| | 23 | 0 | 0 | 1 |
| | 24 | 1 | 0 | 1 |
| | 25 | 0 | 0 | 1 |

2. TÁBLÁZAT (FOLYTATÁS)

| | Vegyület száma | CAT pontérték | | |
|----------|-------------------|---------------|--------|--------|
| | | 0 óra | 22 óra | 44 óra |
| (2,5 ml) | 26 | 0 | 0 | 0 |
| | 28 | 0 | 0 | 1 |
| | 30 | 0 | 2 | 2 |
| | 32 | 0 | 0 | 2 |
| | 33 | 1 | 1 | 1 |
| (2,5 ml) | 35 | 0 | 0 | 1 |
| | 36 | 0 | 0 | 1 |
| | 38 | 0 | 0 | 3 |
| | 39 | 0 | 0 | 1 |
| | 40 | 0 | 0 | 0 |
| (2,5 ml) | 41 | 1 | 0 | 1 |
| | 42 | 2 | 1 | 1 |
| | 43 | 0 | 0 | 2 |
| | 44 | 1 | 0 | 0 |
| | 45 | 1 | 0 | 2 |
| | 46 | 2 | 0 | 1 |
| | 47 | 3 | 0 | 2 |
| | 5 ml kiszerezés | 0 | 0 | 0 |
| | 2,5 ml kiszerezés | 0 | 0 | 0 |
| | 5 % etanol | 1 | 8 | 10 |
| | 5 % butan-1-ol | 1 | 1 | 3 |
| | dH ₂ O | 1 | 0 | 0 |

2. példa

Talajon nőtt növények további kezelése

Ebben a kísérletben vegyületeket feloldunk 50 % aceton - 50 % dH₂O keverékben 0,05 % Tween-20-szal, 200 mg/ml-es oldatként. Ezeket 1,5 %-os és 0,1 %-os oldattá hígítjuk. Levélmintákat távolítunk el a csemetékből mint „nem indukált” kontrollokat. A levéldarabokat megőröljük 200 µl 250 mmól/literes trisz-ben (pH 8,0), centrifugáljuk, a felülúszót kinyerjük és 4°C hőmérsékleten egy éjszakán át tároljuk. 5 ml oldatot alkalmazunk 2 növény mindegyikénél a talajhoz, mint replika kezeléseket gyökéröntözéssel. 22 óra és 65 óra múlva levélmintákat veszünk a kezelt két növény mindegyikéből, extraháljuk úgy, ahogyan az 1. példában leírjuk, és a felülúszókat 4°C hőmérsékleten tároljuk. A mintákat CAT fehérjére mennyiségileg elemezzük a Boehringer Mannheim cég CAT ELISA készletének felhasználásával, és a teljes fehérje szintet Bradford meghatározással határozzuk meg. A vizsgált vegyületeket és az eredményeket a 3. táblázatban mutatjuk be, ahol a CAT pontértékek a 2. táblázatra vonatkoztatott értéket képviselik.

3. TÁBLÁZAT

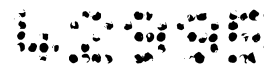
| Vegyület száma | CAT fehérje pontérték | | |
|----------------------|-----------------------|--------|--------|
| | 0 óra | 22 óra | 65 óra |
| 1,5 % gyökér öntözés | | | |
| 17 | 0 | 3 | 1 |
| 50 | 0 | 2 | 1 |
| 51 | 0 | 1 | 3 |
| 52 | 0 | 2 | 1 |
| 53 | 0 | 3 | 8 |
| 54 | 0 | 1 | 2 |
| 55 | 0 | 1 | 1 |
| 56 | 0 | 2 | 1 |
| 57 | 0 | 2 | 5 |
| 58 | 0 | 1 | 0 |
| 59 | 0 | 1 | 1 |
| 61 | 0 | 1 | 1 |
| 62 | 0 | 1 | 2 |
| 63 | 0 | 1 | 1 |
| 64 | 0 | 1 | 1 |
| 65 | 0 | 0 | 1 |
| etanol | 0 | 3 | 6 |
| butan-1-ol | 0 | 3 | 5 |
| kiszereelés | 0 | 0 | 0 |
| dH ₂ O | 0 | 0 | 0 |



3. példa

A kapcsolat expressziója időbeli lefolyásának meghatározása

Abból a célból, hogy meghatározzuk az alc kapcsolat expressziójának időbeli lefolyását az észterekből indukció után, számos vegyületet alkalmazunk a talajba vagy 5 hetes alc CAT homozióta vonal 30 növényének leveleire üvegházban ~ 4 cm-es (~ 1¹/₂") cserepecskékben. A vegyületeket feloldjuk 50% acetón - 50 % dH₂O keverékben, amely 0,05 % Tween-20-at is tartalmaz, vagy 150 mg/ml-es, vagy 50 mg/ml-es oldatot képezve. Ezeket azután 1/10 arányban hígítjuk 1,5 %-os vagy 0,5 %-os oldattá. Levélmintákat veszünk a csemetékből, ezek a „nem indukált” kontrollok. A levéldarabokat lefagyasztjuk szárazjég/etanolban és -70°C hőmérsékleten tároljuk. 5 ml oldatot alkalmazunk vagy gyökér öntözésként vagy levélpermetként legfeljebb 8 növénynél. Levélmintákat veszünk különböző időpontokban, lefagyasztjuk ezeket szárazjég/etanol keverékben és -70°C hőmérsékleten tároljuk. Amikor minden mintát kinyertünk és tároltunk, ezeket 200 µl 250 mmól/literes triszben (pH 8,0) extraháljuk, centrifugáljuk, a felülúszót kinyerjük és 4°C hőmérsékleten egy éjszakán át tároljuk. A mintákat CAT fehérjére elemezzük mennyiségileg egy Boehringer Mannheim CAT ELISA készlettel, míg a teljes fehérje szintet Bradford meghatározással határozzuk meg. A vizsgált vegyületeket és az eredményeket a 4; 5; 6; 7; 8; 9; és 10. táblázatban mutatjuk be. A CAT egységek úgy vannak feltüntetve, mint az 1. példában, az egyes egymást követő számok egy növekvő 5000 ng/g tartományt képviselnek. Az árnyékolt formában bemutatott eredményeket egy elkülönült, de hasonló kísérletben kapjuk meg.



4. TÁBLÁZAT

| Óra | 51. vegyület | CAT pontérték |
|-----|---------------------|---------------|
| 0 | 0,5 % 49 permet (S) | 0 |
| 5 | 0,5 % 49 S | 0 |
| 10 | 0,5 % 49 S | 0 |
| 26 | 0,5 % 49 S | 0 |
| 48 | 0,5 % 49 S | 0 |
| 98 | 0,5 % 49 S | 0 |
| 144 | 0,5 % 49 S | 0 |
| 193 | 0,5 % 49 S | 0 |
| 0 | 1,5 % 49 S | 0 |
| 5 | 1,5 % 49 S | 0 |
| 10 | 1,5 % 49 S | 0 |
| 26 | 1,5 % 49 S | 0 |
| 48 | 1,5 % 49 S | 1 |
| 98 | 1,5 % 49 S | 0 |
| 144 | 1,5 % 49 S | 0 |
| 193 | 1,5 % 49 S | 0 |



4. TÁBLÁZAT (FOLYTATÁS)

| Óra | 51. vegyület | CAT pontérték |
|--------|-------------------------|---------------|
| 0 | 0,5 % gyökérontözés (R) | 0 |
| 5 | 0,5 % 49 R | 0 |
| 10 | 0,5 % 49 R | 1 |
| 26 | 0,5 % 49 R | 2 |
| 48 | 0,5 % 49 R | 1 |
| 98 | 0,5 % 49 R | 4 |
| 144 | 0,5 % 49 R | 4 |
| 193 | 0,5 % 49 R | 0 |
| 0 | 1,5 % 49 R | 0 |
| 10 | 1,5 % 49 R | 1 |
| 22 óra | 1,5 % gyökér | 1 |
| 26 | 1,5 % 49 R | 1 |
| 48 | 1,5 % 49 R | 3 |
| 65 óra | 1,5 % gyökér | 3 |
| 98 | 1,5 % 49 R | 4 |



5. TÁBLÁZAT

| Óra | 57. vegyület | CAT pontérték |
|--------|----------------------------|---------------|
| t=0 | 0,5 % 30 permet (S) | 0 |
| t=5 | 0,5 % 30 S | 0 |
| t=10 | 0,5 % 30 S | 0 |
| t=26 | 0,5 % 30 S | 1 |
| t=48 | 0,5 % 30 S | 1 |
| t=0 | 1,5 % 30 S | 0 |
| t=5 | 1,5 % 30 S | 0 |
| t=10 | 1,5 % 30 S | 0 |
| t=26 | 1,5 % 30 S | 0 |
| t=48 | 1,5 % 30 S | 0 |
| t=0 | 0,5 % 30 gyökéröntözés (R) | 0 |
| t=5 | 0,5 % 30 R | 0 |
| t=10 | 0,5 % 30 R | 1 |
| t=26 | 0,5 % 30 R | 2 |
| t=48 | 0,5 % 30 R | 2 |
| t=98 | 0,5 % 30 R | 4 |
| t=0 | 1,5 % 30 R | 0 |
| t=10 | 1,5 % 30 R | 1 |
| 22 óra | 1,5 % gyökér | 2 |
| t=26 | 1,5 % 30 R | 1 |
| t=48 | 1,5 % 30 R | 2 |
| 65 óra | 1,5 % gyökér | 5 |
| t=98 | 1,5 % 30 R | 3 |



6. TÁBLÁZAT

| Óra | 53. Vegyület | CAT pontérték |
|-----|---------------------|---------------|
| 0 | 0,5 % 51 permet (S) | 0 |
| 5 | 0,5 % 51 S | 0 |
| 10 | 0,5 % 51 S | 1 |
| 26 | 0,5 % 51 S | 1 |
| 48 | 0,5 % 51 S | 1 |
| 98 | 0,5 % 51 S | 1 |
| 144 | 0,5 % 51 S | 1 |
| 193 | 0,5 % 51 S | 0 |
| 0 | 1,5 % 51 S | 0 |
| 5 | 1,5 % 51 S | 1 |
| 10 | 1,5 % 51 S | 2 |
| 26 | 1,5 % 51 S | 1 |
| 48 | 1,5 % 51 S | 1 |
| 98 | 1,5 % 51 S | 1 |
| 144 | 1,5 % 51 S | 0 |
| 193 | 1,5 % 51 S | 1 |



6. TÁBLÁZAT (FOLYTATÁS)

| Óra | 53. Vegyület | CAT pontérték |
|--------|----------------------------|---------------|
| 0 | 0,5 % 51 gyökérontözés (R) | 0 |
| 5 | 0,5 % 51 R | 1 |
| 10 | 0,5 % 51 R | 1 |
| 26 | 0,5 % 51 R | 1 |
| 48 | 0,5 % 51 R | 1 |
| 98 | 0,5 % 51 R | 3 |
| 144 | 0,5 % 51 R | 2 |
| 193 | 0,5 % 51 R | 0 |
| 0 | 1,5 % 51 R | 0 |
| 10 | 1,5 % 51 R | 1 |
| 22 óra | 1,5 % gyökér | 4 |
| 26 | 1,5 % 51 R | 4 |
| 48 | 1,5 % 51 R | 8 |
| 65 óra | 1,5 % gyökér | 8 |
| 98 | 1,5 % 51 R | 5 |



7. TÁBLÁZAT

| Óra | 60. vegyület | CAT pontérték |
|--------|----------------------------|---------------|
| t=0 | 0,5 % 57 gyökéröntözés (R) | 0 |
| t=10 | 0,5 % 57 R | 1 |
| t=26 | 0,5 % 57 R | 1 |
| t=48 | 0,5 % 57 R | 2 |
| t=98 | 0,5 % 57 R | 5 |
| t=144 | 0,5 % 57 R | 8 |
| t=0 | 1,5 % 57 R | 0 |
| t=10 | 1,5 % 57 R | 1 |
| 22 óra | 1,5 % gyökér | 1 |
| t=26 | 1,5 % 57 R | 1 |
| t=48 | 1,5 % 57 R | 1 |
| 65 óra | 1,5 % gyökér | 1 |
| t=98 | 1,5 % 57 R | 4 |

8. TÁBLÁZAT

| Óra | 52. vegyület | CAT pontérték |
|-------|---------------------|---------------|
| t=0 | 0,5 % 50 permet (S) | 0 |
| t=10 | 0,5 % 50 S | 0 |
| t=26 | 0,5 % 50 S | 0 |
| t=48 | 0,5 % 50 S | 1 |
| t=98 | 0,5 % 50 S | 0 |
| t=144 | 0,5 % 50 S | 0 |
| t=193 | 0,5 % 50 S | 0 |
| t=0 | 1,5 % 50 S | 0 |
| t=10 | 1,5 % 50 S | 0 |
| t=26 | 1,5 % 50 S | 0 |
| t=48 | 1,5 % 50 S | 0 |
| t=98 | 1,5 % 50 S | 0 |
| t=144 | 1,5 % 50 S | 0 |
| t=193 | 1,5 % 50 S | 0 |



8. TÁBLÁZAT (FOLYTATÁS)

| Óra | 52. vegyület | CAT pontérték |
|--------|----------------------------|---------------|
| t=0 | 0,5 % 50 gyökérontözés (R) | 0 |
| t=10 | 0,5 % 50 R | 1 |
| t=26 | 0,5 % 50 R | 1 |
| t=48 | 0,5 % 50 R | 2 |
| t=98 | 0,5 % 50 R | 1 |
| t=144 | 0,5 % 50 R | 1 |
| t=193 | 0,5 % 50 R | 1 |
| t=0 | 1,5 % 50 R | 0 |
| t=10 | 1,5 % 50 R | 0 |
| 22 óra | 1,5 % gyökér | 2 |
| t=26 | 1,5 % 50 R | 1 |
| t=48 | 1,5 % 50 R | 2 |
| 65 óra | 1,5 % gyökér | 1 |
| t=98 | 1,5 % 50 R | 1 |

9. TÁBLÁZAT

| Óra | Ethanol | CAT pontérték |
|-----|-----------------------|---------------|
| 0 | EtOH 0,5 % permet (S) | 0 |
| 5 | EtOH 0,5 % S | 2 |
| 10 | EtOH 0,5 % S | 2 |
| 26 | EtOH 0,5 % S | 2 |
| 48 | EtOH 0,5 % S | 1 |
| 98 | EtOH 0,5 % S | 1 |
| 144 | EtOH 0,5 % S | 1 |
| 193 | EtOH 0,5 % S | 1 |
| 0 | EtOH 1,5 % S | 0 |
| 5 | EtOH 1,5 % S | 2 |
| 10 | EtOH 1,5 % S | 4 |
| 26 | EtOH 1,5 % S | 5 |
| 48 | EtOH 1,5 % S | 4 |
| 98 | EtOH 1,5 % S | 2 |
| 144 | EtOH 1,5 % S | 2 |
| 193 | EtOH 1,5 % S | 1 |

9. TÁBLÁZAT (FOLYTATÁS)

| Óra | Ethanol | CAT pontérték |
|-----|--------------------------|---------------|
| 0 | EtOH 0,5 % gyökéröntözés | 0 |
| 5 | EtOH 0,5 % R | 2 |
| 10 | EtOH 0,5 % R | 4 |
| 26 | EtOH 0,5 % R | 6 |
| 48 | EtOH 0,5 % R | 4 |
| 98 | EtOH 0,5 % R | 4 |
| 144 | EtOH 0,5 % R | 4 |
| 193 | EtOH 0,5 % R | 3 |
| 0 | EtOH 1,5 % R | 0 |
| 10 | EtOH 1,5 % R | 4 |
| 26 | EtOH 1,5 % R | 9 |
| 48 | EtOH 1,5 % R | 7 |
| 98 | EtOH 1,5 % R | 6 |



10. TÁBLÁZAT

| Óra | dH ₂ O | CAT pontérték |
|-------------------|-------------------------------------|---------------|
| 0 | dH ₂ O Gyökéröntözés (R) | 0 |
| 5 | dH ₂ O R | 0 |
| 10 | dH ₂ O R | 0 |
| 26 | dH ₂ O R | 0 |
| 48 | dH ₂ O R | 0 |
| 98 | dH ₂ O R | 0 |
| 144 | dH ₂ O R | 0 |
| 193 | dH ₂ O R | 0 |
| Kiszerelés óra | | |
| 0 | Permet (S) | 0 |
| 5 | S | 0 |
| 10 | S | 0 |
| 26 | S | 0 |
| 48 | S | 0 |
| 98 | S | 0 |
| 144 | S | 0 |
| 193 | S | 0 |
| 0 | Gyökéröntözés (R) | 0 |
| 5 | R | 0 |
| 10 | R | 0 |
| 26 | R | 0 |
| 48 | R | 1 |
| 98 | R | 1 |
| 144 | R | 1 |
| 193 | R | 0 |



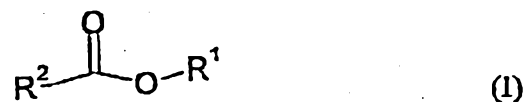
Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az indukció időbeli lefolyása változtatható a találmánnyal összhangban levő észterek alkalmazásával az alkoholokkal összehasonlítva. Így az észterek megfelelő kiválasztása kedvező indukciós profilhoz vezet.



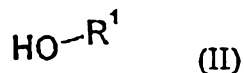
SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Mezőgazdaságilag elfogadható, γ -butirolaktontól eltérő hidrolizálható észter alkalmazása növényi gén expressziójának szabályozásában, ahol az említett szabályozásra egy indukálható promóter hat, amely az aktiváláshoz egy exogén kémiai anyag, amely alkoholt tartalmazhat, jelenlétét igényli, ahol az említett mezőgazdaságilag elfogadható észter hidrolizise az említett alkohol keletkezéséhez vezet.

2. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a mezőgazdaságilag elfogadható hidrolizálható észter valamely (I) általános képletű vegyület



ahol a képletben R^1 jelentése kis szénatomszámú alkilcsoport, R^2 jelentése valamely szerves csoport, amely hidrolíziskor valamely $\text{R}^2\text{-COOH}$ általános képletű, mezőgazdaságilag elfogadható savat alakít ki; és az említett promóter igényli egy (II) általános képletű alkohol jelenlétét



ennek aktiválásához.

3. A 2. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a (II) általános képletű vegyület kis szénatomszámú alkil-alkohol, ahol az R^1 alkilcsoport 1–4 szénatommal bír és lehet elágazó szénláncú vagy egyenes szénláncú.

4. A 2. vagy 3. igénypont szerinti alkalmazás, ahol R^2 jelentése kivánt esetben helyettesített alkil-, kivánt esetben helyettesített cikloalkil-, kivánt esetben helyettesített alkenil-, kivánt esetben helyet-



tesített alkinil-, kívánt esetben helyettesített aril- vagy kívánt esetben helyettesített heterociklilcsoport.

5. A 4. igénypont szerinti alkalmazás, ahol R^2 jelentése kívánt esetben helyettesített 1–10 szénatomos alkilcsoport.

6. Az 5. igénypont szerinti alkalmazás, ahol R^2 valamely alkoxi-karbonilcsoporttal vagy dialkil-acetállal van helyettesítve.

7. Az 1–6. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, ahol az (I) általános képletű vegyület etil-2-n-pentil-3-oxobutanoát; trietil-2-karboxi-heptán-1,7-dioát; vagy etil-2,4-dimetoxi-benzoát.

8. Eljárás cél gén expressziójának szabályozására valamely növényben azzal jellemezve, hogy az említett növényt valamely kémiai-lag indukálható növényi gén expressziós kazettával transzformáljuk, amely kazetta tartalmaz egy első promótert működőképesen hozzákapcsolva egy szabályozó fehérjét kódoló szabályozó szekvenciához, továbbá egy indukálható promótert működőképesen hozzákapcsolva egy cél génhez, ahol az indukálható promótert a szabályozó fehérje aktiválja egy alkohol jelenlétében, ahol az említett eljárás keretében egy γ -butirolaktontól eltérő, mezőgazdaságilag elfogadható hidrolizálható észtert alkalmazunk az említett növényhez, amely az észter hidrolizisekor kialakítja az említett alkoholt és így a cél gén expresszióját idézi elő.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a szabályozó szekvencia a leírásban ismertetett alcR fehérjét kódolja és az indukálható promóter az alcA promóter szekvencia.

10. A 8. vagy 9. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a növényt úgy transzformáljuk, hogy ez expresszáljon, vagy túlexpresszáljon valamely enzimet, katalitikus antitestet vagy ennek katalitikusan aktív fragmentumát, amely az észtert hidrolizálja az említett alkoholt alakítva ki.

11. Növényi gén expressziós rendszer, amely az alábbiakat tartalmazza:

(i) egy első promótert működőképesen összekapcsolva egy szabályozó fehérjét kódoló szabályozó szekvenciával;

(ii) egy indukálható promótert működőképesen összekapcsolva egy cél génnel, ahol az indukálható promótert a szabályozó fehérje aktiválja valamely hatékony exogén induktor alkohol jelenlétében, ezáltal az alkohol alkalmazása a cél gén expresszióját idézi elő; és

(iii) olyan fehérjét kódoló szekvenciát, amely hatással van egy észter hidrolízisére egy további promóter szabályozása alatt, amely lehetővé teszi ennek expresszióját növényi szövetben.

12. Növényi sejt, amely a 11. igénypont szerinti gén expressziós rendszert tartalmazza.

13. Növényi szövet vagy növény, amely 12. igénypont szerinti sejteket tartalmaz, és ezekből származó növények vagy magok, amelyek tartalmaznak egy 11. igénypont szerinti gén expressziós rendszert.

14. Mezőgazdasági kompozíció, amely valamely 1. igénypont szerinti, mezőgazdaságilag elfogadható észtert tartalmaz valamely hígítóval vagy hordozóval együtt.

15. A 14. igénypont szerinti kompozíció, ahol a mezőgazdaságilag elfogadható észter valamely 2. igénypont szerinti, (I) általános képletű vegyület.

16. A 14. vagy 15. igénypont szerinti kompozíció, amely tartalmaz továbbá valamely emulgeáló szert is.

17. A 16. igénypont szerinti kompozíció, amelyben az emulgeáló szer PVA.

18. Eljárás cél gén expressziójának szabályozására valamely növényben azzal jellemezve, hogy az említett növényt valamely kémiai-
lag indukálható növényi gén expressziós kazettával transzformáljuk, amely kazetta tartalmaz egy első promótert működőképesen hozzá-
kapcsolva egy szabályozó fehérjét kódoló szabályozó szekvenciához, továbbá egy indukálható promótert működőképesen hozzákapcsolva
egy cél génhez, ahol az indukálható promótert a szabályozó fehérje aktiválja egy alkohol jelenlétében, és ahol a növény továbbá úgy van
transzformálva, hogy expresszáljon vagy túlexpresszáljon egy enzi-
met, katalitikus antitestet vagy ennek katalitikusan aktív fragmentu-
mát, amely hidrolizál egy észtert alkoholt alakítva ki, ahol az említett
eljárás keretében egy mezőgazdaságilag elfogadható hidrolizálható
észtert alkalmazunk az említett növényben, amely észter hidrolíziskor
kialakítja az említett alkoholt és így a cél gén expresszióját idézi elő.

A meghatalmazott:

Dr. Jalsovszky Györgyné
ügyvéd
1093 Budapest, Közraktár u. 24.
Tel.: 218-4148 Fax: 218-4506