

PŘÍHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2001 - 794

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **27.08.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **02.09.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/19840028**

(33) Země priority: **DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.01.2002**
(Věstník č. 1/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/EP99/06319**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/14246**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷ :

C 12 N 15/52

C 12 N 9/10

C 12 N 15/31

C 12 N 5/10

C 12 N 15/82

C 12 P 19/18

(71) Přihlašovatel:

**MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E. V.,
Berlin, DE;**

(72) Původce:

**Heyer Arnd G., Berlin, DE;
Rehm Jochen, Berlin, DE;
Wendenburg Regina, Berlin, DE;**

(74) Zástupce:

Všetečka Miloš JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Molekuly nukleové kyseliny kódující enzymy s
fruktosyltransferázovou aktivitou a jejich použití**

(57) Anotace:

Řešení popisuje molekuly nukleové kyseliny, které kódují polypeptidy mající fruktosyltransferázovou enzymatickou aktivitu. Také vektory, hostitelské buňky a transgenní rostliny, které obsahují molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu jsou popsány. Kromě toho řešení poskytuje způsob výroby polyfruktózy, zejména polyfruktózy inulinového typu, užitím hostitelských organismů podle vynálezu a/nebo fruktosyltransferázy produkované těmito hostiteli.

00.05.01

P1 2001-494
33358

1

Molekuly nukleové kyseliny kódující enzymy
s fruktosyltransferázovou aktivitou a jejich použití

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká molekul nukleové kyseliny kódující polypeptidy mající fruktosyltransferázovou enzymatickou aktivitu. Dále se vynález týká vektorů a hostitelů, obsahujících takové molekuly nukleové kyseliny. Také se týká způsobů přípravy fruktosyltransferázy a výroby polyfruktózy inulínového typu v různých hostitelských organizmech nebo *in vitro*, a také fruktosyltransferázy kódované molekulami nukleové kyseliny podle vynálezu, které mohou být využity pro výrobu polyfruktózy inulínového typu.

Dosavadní stav techniky

Ve vodě rozpustné lineární polymery nalézají mnoho způsobů využití, např. je lze užít ke zvýšení viskozity vodných systémů, jako detergenty, suspenzační činidla nebo pro urychlení sedimentace a vytváření komplexů, ale také pro vázání vody. Polymery založené na sacharidech, např. fruktosylové polysacharidy, jsou zvláště zajímavým výchozím materiálem, neboť jsou biologicky degradovatelné.

Kromě jejich použití jako obnovitelných surovin pro průmyslovou výrobu, fruktosylové polymery jsou zajímavé jako aditiva do potravin, např. jako sladidla. Pro různé aplikace jsou potřebné polymery s různou délkou řetězce. Zatímco výhodné polymery pro potravinářský průmysl jsou krátké nebo

středně dlouhé, pro technické použití, např. jako surfaktanty, jsou potřebné polymery s vysokým stupněm polymerizace (DP).

Byly popsány různé způsoby přípravy fruktanových polysacharidů v rostlinách tím, že se exprimovaly fruktosyltransferázy bakteriálního původu nebo polyfruktózy se střední délkou řetězců tím, že se exprimovaly fruktosyltransferázy rostlinného původu. Např. PCT/US89/02729 popisuje možnost vytvářet sacharidové polymery, zejména dextran nebo polyfruktózu, v transgenních rostlinách, zejména v plodech transgenních rostlin. Pro přípravu takto modifikovaných rostlin bylo navrženo použití levansacharázy z mikroorganismů, zejména *Aerobacter levanicum*, *Streptococcus salivarius* a *Bacillus subtilis*, nebo dextransacharázy z *Leuconostoc mesenteroides*. Avšak nebyla popsána ani příprava aktivních enzymů, ani produkce levanu nebo dextranu v transgenních rostlinách.

PCT/EP93/0211 popisuje způsob přípravy transgenních rostlin, které exprimují gen lsc pro levansacharázu z gram-negativní bakterie *Erwinia amylovora*. Tyto rostliny vytvářejí vysokomolekulární silně rozvětvený levan.

PCT/NL93/00279 popisuje transformaci rostlin chimérickými geny, které obsahují gen sacB z *Bacillus subtilis*. Tyto rostliny tvoří rozvětvený levan.

Bakteriální fruktosyltransferáza použitá v PCT/US89/02729, PCT/EP93/02110 a PCT/NL93/00279 syntetizuje levan, což je β -2,6 vázaný fruktosylový polymer, který má četná větvení typu β -2,1. Avšak vzhledem k četnému větvení má levan rozhodně nevýhody pro technické využití, a je tudíž mnohem méně žádán jakožto výchozí materiál na rozdíl od

inulínu, který má β -2,1 vazby. V současnosti je znám jen jeden bakteriální gen, jehož produkt se podílí na syntéze inulínu, a sice jde o gen ftf ze *Streptococcus mutans*. PCT/NL93/00279 popisuje transformaci rostlin tímto genem, které syntetizovaly vysokomolekulární inulín, ale v tak malém množství, že není vhodné k průmyslovému využití. PCT/EP97/02195 popisuje také způsob přípravy transgenních rostlin s genem ftf ze *Streptococcus mutans*. Produkující inulin. Stejně jako u rostlin popsanych v PCT/NL93/00279 byl však výtěžek inulínu nízký. Je sice možné exprimovat gen, který byl předem upraven, v transgenních rostlinách, ale výtěžek inulínu z transgenních rostlin je tak nízký, že rostliny nejsou vhodné pro průmyslové využití.

Kromě toho PCT/NL96/00012 popisuje DNA sekvence, které kódují enzymy syntetizující sacharidy a také přípravu transgenních rostlin pomocí těchto sekvencí. Sekvence popsané ve vynálezu pocházejí z *Helianthus tuberosus*. Podle PCT/NL96/00012 se sekvence mohou užít k modifikaci profilu fruktanů u petunie, bramboru i samotné *Helianthus tuberosus*. Expres sekvence popsané ve vynálezu, která kóduje sacharózofruktosyltransferázu (SST) závislou na sacharóze nebo frukotsyltransferázu, v transgenních rostlinách umožňuje produkci inulínu. Průměrný stupeň polymerizace inulínu je DP=6 až DP=10. S takovým stupněm polymerizace nemůže být inulin považován za polymer s dlouhým řetězcem. Způsob popsany v PCT/NL96/00012 nedovoluje produkovat vysokomolekulární inulin.

Nedávno Rehm a kol. (J. Bacteriology 180 (1998), 1305-1310) popsali produkci oligosacharidů v kvasinkách po vnesení SST z *Aspergillus foetidus*. Avšak polymerizační stupeň produktu byl pouze DP = 3.

DE 197 08 774.4 se týká produkce 1-kestózy a nystózy užitím enzymů s fruktosylpolymerázovou aktivitou. V transgenních rostlinách se tak mohou tvořit tri- a tetrasacharidy. Výtěžek byl vysoký a u bramboru odpovídal buněčnému obsahu sacharózy. Avšak nebyla popsána produkce inulínů s delším řetězcem.

Syntéza polyfruktóz v houbách byla také diskutována v mnoha publikacích. Např. Barthomeuf a Pourrat (Biotechnology Letters 17 (1995), 911-916) popsali přípravu enzymu s fruktosyltransferázovou aktivitou z *Penicillium rugulosum*. Preparát však vykazoval různé enzymatické aktivity a nejednalo se tudíž o čistou fruktosyltransferázu. DNA sekvence genu pro fruktosyltransferázu není známa. Cairns a kol. (New Phytologist 129 (1995), 299-308) popsal přechodnou syntézu tri-, tetra- a pentasaccharidů ze sacharózy v kultivačním médiu *Monographella nivalis*. odpovídající enzymatická aktivita se zdá být zejména hydrolytické povahy, neboť polyfruktózy jsou opět degradovány s rostoucím vyčerpáním substrátu. Jelikož není známa žádná DNA sekvence, není možné zhodnotit, spoléhajíc na homologii s fruktofuranosidázami (invertázami), zda jde skutečně o fruktosyltransferázu v pravém smyslu nebo o invertázu.

U houby *Aspergillus sydowi* IAM 2544 bylo ukázáno, že je schopná vytvářet polyfruktózy inulinového typu. Harada a kol. (in: Nishinari and Doi (Eds.), Food Hydrocolloids: Structures, Properties and Functions, Plenum, New York (1994), 77-82) popsali syntézu inulinu pomocí konidií *Aspergillus sydowi*. 125 g konidií bylo inkubováno ve 25 l 20 % roztoku sacharózy a vytvořený produkt byl purifikován pomocí HPLC. Avšak tento proces není vhodný pro průmyslovou výrobu inulinu ve velkém měřítku. Maramatsu a kol. (Agric.

Biol. Chem. 52 (1988), 1303-1304) popsali produkci fruktooligosacharidů pomocí mycelií téže houby (*A. sydowi* IAM 2544). Stupeň polymerizace byl v takovém případě 3 až 13. Enzymy zúčastněné v této syntéze byly jen částečně purifikovány nebo nebyly purifikovány vůbec. Aminokyselinové sekvence nebo DNA sekvence příslušných enzymů nejsou známy. Návod pro purifikaci proteinů buďto nebyl popsán nebo byl popsán neúplně.

Cílem proto bylo poskytnout molekuly nukleové kyseliny a způsoby, které umožňují vytvářet geneticky modifikované organismy schopné produkovat polyfruktózu inulinového typu. tohoto cíle bylo dosaženo v předkládaném vynálezu.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález se týká molekul nukleové kyseliny kódujících fruktosyltransferázu, které jsou vybrány ze skupiny obsahující:

- a) molekuly nukleové kyseliny kódující protein obsahující aminokyselinovou sekvenci uvedenou zde jako sekvence identifikačního čísla (id. č.) 2,
- b) molekuly nukleové kyseliny obsahující nukleotidovou sekvenci kódujícího úseku uvedeného v sekvenci id. č. 1 odpovídající ribonukleotidovou sekvenci,
- c) molekuly nukleové kyseliny hybridizující s řetězcem komplementárním k molekulám nukleové kyseliny uvedeným v bodech a) nebo b), a
- d) molekuly nukleové kyseliny, jejichž nukleotidové sekvence se liší od sekvencí uvedených v c) díky

degeneraci genetického kódu,
a také všechny molekuly nukleové kyseliny, které jsou
k nim komplementární.

Sekvence uvedená zde jako sekvence id. č. 1 kóduje
fruktanfruktosyltransferázu závislou na sacharóze z
Aspergillus sydowi, která v rostlinné buňce syntetizuje
polyfruktany inulinového typu s dlouhým řetězcem. Překvapivě
bylo zjištěno, že je možné produkovat polyfruktany
inulinového typu s dlouhým řetězcem s dobrým výtěžkem
v hostitelském organismu, zejména když se sekvence podle
vynálezu užití v transgenních rostlinách, bakteriích nebo
houbách.

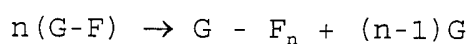
V rámci předkládaného vynálezu byl vypracován postup
purifikace enzymu z *Aspergillus sydowi*. Enzym byl purifikován
do homogenity, aby bylo možné stanovit sekvenci aminokyselin.
Na základě aminokyselinových sekvencí byly připraveny
oligonukleotidové primery pro polymerázovou řetězovou reakci
(PCR). Pomocí těchto primerů byly amplifikovány genové
fragmenty, které pak byly použity pro screening cDNA
knihoven. Bylo připraveno několik molekul cDNA se sekvenční
homologií s PCR produkty. Většina takto získaných molekul
obsahovala inzerty stejné velikosti. Úplnost cDNA molekuly
byla potvrzena funkční expresí sekvence DNA v *Saccharomyces*
nebo bramboru.

Purifikace enzymů, návrh oligonukleotidových primerů
pro PCR, identifikace molekul cDNA a heterologní exprese jsou
popsány v příkladech. izolovaná sekvence DNA a z ní odvozená
proteinová sekvence jsou zde uvedeny jako sekvence id. č. 1 a
2. Sekvence DNA podle vynálezu je první popsaná sekvence
kódující fruktanfruktosyltransferázu závislou na sacharóze z

hub. Sekvence DNA a jí kódovaná proteinová sekvence se významně liší od sekvencí již známých fruktosyltransferáz. tak např. je ze pouze 22,6% a 39% identita s fruktosyltransferázou z *Aspergillus naeslundii* lev j z hlediska proteinové a DNA sekvence, v uvedeném pořadí. Přestože je zde 64% a 60,6% identita z hlediska proteinové a DNA sekvence z invertázou z *Aspergillus niger*, protein kódovaný tímto genem má zcela jinou aktivitu. Takže bylo ukázáno, že molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu a fruktosyltransferázy, které kódují, jsou molekuly, které nebyly dosud popsány.

V kontextu předkládaného vynálezu fruktosyltransferázou se rozumí protein, který je schopen katalyzovat spojení β -2,1-glykosidické a/nebo β -2,6-glykosidické vazby mezi fruktózovými jednotkami. Přenášené fruktosylové zbytky pocházejí ze sacharózy.

Reakci katalyzovanou fruktanfruktosyltransferázou závislou na sacharóze podle vynálezu lze znázornit následujícím schematem:



kde G = glukóza, F = fruktóza a G - F = sacharóza, tzn. enzym přenáší fruktózový zbytek ze sacharózy na polyfruktan, který je vytvářen z molekuly sacharózy pomocí β -2,1-glykosidické vazby, přičemž se mohou vyskytnout i vazby β -2,6 glykosidické.

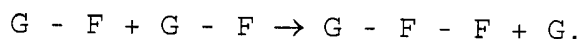
Polypeptid kódovaný molekulou nukleové kyseliny podle vynálezu s fruktosyltransferázovou aktivitou vede k syntéze polyfruktózy a v rostlinné buňce zejména k polyfruktóze inulínového typu (v popisu nazývané též jen inulín).

Termín polyfruktóza podle vynálezu označuje polyfruktan

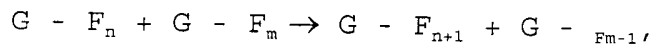
se stupněm polymerizace $DP \geq 4$, výhodně $DP \geq 6$ a specificky $DP \geq 8$. Polyfruktóza inulínového typu nebo zkráceně inulín označují podle vynálezu fruktanový polymer s dlouhým řetězcem, tj. molekulu, kde jsou jednotky vázány hlavně β -2,1-glykosidickou vazbou, ale případně se vyskytuje i větvení β -2,6. Termín „dlouhý řetězec“ v této souvislosti znamená, že stupeň polymerizace (DP) je větší než 20, výhodně větší než 50, výhodněji větší než 100 a nejvýhodněji větší než 200. Fruktosylový polymer může nést terminální glukózový zbytek, který je navázán prostřednictvím C-1 OH skupiny glukózy a C-2 OH skupiny fruktosylového zbytku. V tomto případě jeden fruktosylový polymer obsahuje jednu molekulu sacharózy.

Pokud je enzym podle vynálezu užit pro syntézu polyfruktanu *in vitro*, získá se oligomerní produkt ($DP=4$ až 10).

Enzym kódovaný molekulou nukleové kyseliny podle vynálezu lze odlišit od známých fruktosyltransferáz prostřednictvím katalyzované reakce. tak např. známé rostlinné SST katalyzují reakci:

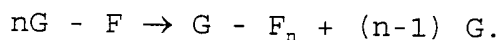


Avšak fruktosyltransferázy závislé na fruktanu z rostlin katalyzují následující reakci:



příčemž tato reakce je plně reverzibilní.

Bakteriální fruktosyltransferázy, např. kódované genem sacB gene z *Bacillus subtilis* také katalyzují reakci typu



Avšak tyto enzymy produkují levan, polyfruktan vázaný β -2,6-glykosidickými vazbami s β -2,1-větvením

Zatímco protein (FTF) kódovaný genem ftf ze *Streptococcus mutans* indukuje syntézu inulínu s molekulovou hmotností několik milionů Daltonů. Avšak gen *ftf* nebo kódovaný protein nevykazují významnou homologii se sekvencí nukleové kyseliny uvedenou jako sekvence id. č. 1 (pouze 37,3 %) nebo aminokyselinovou sekvencí uvedenou zde jako sekvence id. č. 2 (jen 22,6 %).

Podle předkládaného vynálezu termín „hybridizace“ znamená hybridizaci za obvyklých podmínek, výhodně za stringentních podmínek, jak jsou např. popsány v publikaci Sambrook a kol., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Příkladem stringentních podmínek je: 50% formamid, 5 x SSC, 5 x Denhardtův roztok, 40 mM hydrogensfosforečnan sodný, pH 6,8; 0.5% (hmot./objem) BSA, 1% (hmot./objem) SDS, 0.1 mg/ml DNA ze spermatu sledů, při hybridizační teplotě 42°C a následném promývání filtrů v 0.5 x SSC/0.5% SDS při 60°C.

Příkladem obvyklé hybridizace v nestringentních podmínkách je hybridizace stejná jak je popsána výše, s výjimkou toho, že místo 50% formamidu se užije 30% formamid a následně jsou filtry promývány v 2 x SSC/0.5% SDS při 56°C.

Molekuly nukleové kyseliny hybridizující s molekulami podle vynálezu mohou být izolovány z genomických nebo cDNA knihoven připravených především z hub. Takové molekuly nukleových kyselin mohou být identifikovány a izolovány pomocí molekul podle vynálezu nebo jejich fragmentů nebo reverzních komplementárních molekul, např. hybridizací ve standardních podmínkách (viz např. Sambrook a kol., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Molekuly

nukleové kyseliny se mohou užít jako hybridizační sonda, která má přesně a nebo v podstatě sekvenci jako je sekvence id. č. 1 nebo její fragmenty. Fragmenty použité pro hybridizaci mohou být také syntetické fragmenty, které byly připraveny obvyklou metodou, a jejichž sekvence je v podstatě identická se sekvencí molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu.

K molekulám hybridizujícím s molekulami nukleové kyseliny podle vynálezu patří také fragmenty, deriváty a alelické varianty molekul nukleové kyseliny popsaných výše, které kódují protein podle vynálezu. Termín „fragmenty“ podle vynálezu znamená části molekul nukleové kyseliny, které jsou dostatečně dlouhé na to, aby kódovaly proteiny s fruktosyltransferázovou aktivitou. Termín „derivát“ podle vynálezu znamená, že sekvence této molekuly se liší od výše popsaných molekul v jedné nebo více pozicích, avšak vykazuje vysoký stupeň homologie s těmito sekvencemi. Homologie znamená alespoň 40% sekvenční identitu, zejména alespoň 60% identitu, výhodně alespoň 80% identitu a ještě výhodně nejméně 90% identitu. Proteiny kódované těmito nukleovými kyselinami výhodně mají alespoň 60% sekvenční identitu s aminokyselinovou sekvencí id. č. 2, výhodně alespoň 70%, zvláště 80% a nejvýhodněji 95% identitu. Odchylky od sekvence molekul nukleové kyseliny podle vynálezu mohou být způsobeny např. delecemi, substitucemi, inzercemi a/nebo rekombinací. Molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu mohou být i jiné deriváty sekvencí pocházejících z hub. Derivatizace takových sekvencí může být potřebná k tomu, aby se optimalizovala exprese v určitých hostitelských buňkách.

Molekuly nukleových kyselin, které jsou homologické s molekulami pospanými výše a představují deriváty těchto

molekul, jsou obvykle variace těchto molekul, které vykazují stejnou biologickou funkci. Tyto variace jsou buďto přirozeně se vyskytující variace nebo jsou vneseny specifickou mutagenézí. Variace mohou být také synteticky připravené sekvence. Alelické varianty jsou buďto přirozeně se vyskytující varianty, nebo varianty připravené synteticky nebo technikami rekombinantní DNA.

Proteiny kódované různými variantami molekul nukleové kyseliny podle vynálezu mají výhodně určité společné vlastnosti, jako je např. enzymatická aktivita, molekulová hmotnost, imunologická reaktivita, konformace nebo fyzikální vlastnosti jako je elektroforetická mobilita při gelové elektroforéze, chromatografické vlastnosti, sedimentační koeficient, rozpustnost, spektroskopické vlastnosti, stabilita, pH optimum nebo teplotní optimum.

Ve výhodném provedení molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu kódují polypeptid mající vlastnosti fruktosyltransferázy z hub, zejména výhodně z *Aspergillus*, a nejvýhodněji fruktosyltransferázy z *Aspergillus sydowi*.

Molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu jsou molekuly DNA nebo RNA. Příklady odpovídajících molekul DNA jsou molekuly genomické DNA nebo cDNA. Molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu mohou být izolovány z přírodních zdrojů, např. z hub, zejména z *Aspergillus*, a nejvýhodněji z *Aspergillus sydowi*, nebo se syntetizují známými metodami. Je také možné vnést různé mutace do molekul nukleové kyseliny podle vynálezu metodami známými v molekulární biologii (viz např. Sambrook a kol., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Vnesení mutací indukuje syntézu proteinů s potenciálně změněnými biologickými vlastnostmi. Jeden z

přístupů je vytvářet deleční mutanty, kde molekuly nukleové kyseliny mají progresivní delece na 5'- nebo 3'-konci kódujícího úseku DNA, což vede k syntéze proteinů odpovídajícím způsobem zkrácených. Dalším přístupem je specificky vytvářet enzymy lokalizované v různých kompartmentech díky připojení různých signálních sekvencí. Aby bylo dosaženo lokalizace proteinů podle vynálezu v cytosolu, není třeba k sekvenci id. č. 2 přidávat žádnou signální sekvenci.

Na druhé straně mohou být vneseny bodové mutace do takových pozic, kde modifikace aminokyselinové sekvence ovlivní např. enzymatickou aktivitu nebo regulaci enzymu. Tímto způsobem lze připravit např. mutanty s modifikovanou K_m hodnotou, nebo mutanty, které již nepodléhají allosterické regulaci nebo kovalentní modifikaci, které se obvykle v buňce vyskytují.

Kromě toho se mohou vytvořit mutanty s modifikovanou substrátovou nebo produktovou specificitou. Navíc se mohou vytvořit i mutanty s modifikovaným profilem aktivita-teplota.

Pro genetické manipulace v prokaryotických buňkách se molekuly nukleových kyselin podle vynálezu nebo jejich fragmenty integrují do plazmidů, které umožňují mutagenezi nebo modifikaci sekvence rekombinací DNA sekvencí. Pomocí v oboru známých metod (viz např. Sambrook a kol., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) lze provést záměnu bazí nebo lze přidat přírodní nebo syntetickou sekvenci. Aby bylo možné připojit DNA fragmenty, k fragmentům se mohou připojit adaptéry nebo linkery. Navíc lze využít manipulací, které nabízejí různá restriční místa nebo kterými lze odstranit nadbytečnou DNA nebo restriční místa.

Kdekoliiv mohou být užitečné inserce, delece nebo substituce, je možné užít metody mutageneze *in vitro*, „opravy primeru“, restrikce nebo ligace. Pro analýzu se obvykle užívá sekvencování, analýza restrikčních fragmentů a další biochemické a molekulárně biologické metody.

Dále se vynález týká vektorů, které obsahují molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu. Výhodně jsou tyto vektory plazmidy, kozmidy, viry, bakteriofágy a další vektory, které jsou v oboru známy.

Výhodně jsou molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu operativně spojeny ve vektoru podle vynálezu s regulačními elementy, které dovolují transkripci a syntézu translatovatelné RNA v prokaryotických a/nebo eukaryotických buňkách. Tak např. vektory podle vynálezu obsahují následující elementy:

1. Promotor, který zaručuje transkripci „downstream“ ležícího kódujícího úseku v buňce hostitelského organismu, a případně také zesilovací elementy.
2. Kódující úsek fúzovaný s promotorem, který obsahuje alespoň jeden otevřený čtecí rámec pro translaci polypeptidu. V předkládaném vynálezu je kódujícím úsekem molekula nukleové kyseliny podle vynálezu.
3. Případně další sekvence fúzované s kódujícím úsekem, např. signál pro terminaci transkripce, pokud jsou vyžadovány pro úspěšnou genovou expresi v určitém hostitelském organismu, nebo signální sekvence ovlivňující subcelulární lokalizaci genového produktu nebo indukující sekreci proteinu.

Takové vektory mohou obsahovat ještě další geny jako jsou např. markerové geny umožňující selekci vektoru ve vhodné hostitelské buňce ve vhodných podmínkách. Exprese

molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu zahrnuje transkripci nukleové kyseliny do translatovatelné RNA. Regulační prvky umožňující expresi v prokaryotické buňce a v eukaryotické buňce jsou odborníkům známy. K možným regulačním elementům vhodným pro expresi molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu v prokaryotické hostitelské buňce patří např. promotory P_L , lac, trp nebo tac v *E. coli*. Zvláště výhodné je užití promotoru lacZ, který je v *E. coli* indukovatelný IPTG. Příklady regulačních elementů vhodných pro expresi v eukaryotické buňce jsou promotory AOX1 a GAL1 v kvasinkách, a promotory CMV, SV40 a RSV, a zesilovače (enhancery) CMV, SV40 nebo globinového intronu v savčích nebo jiných živočišných buňkách. Pro expresi v kvasinkách je zvláště výhodné užití promotoru genu alkoholdehydrogenázy ze *Saccharomyces cerevisiae*, který je v kvasinkách vysoce aktivní. Další vhodné systémy lze najít popsané ve stavu techniky, např. v Sambrook, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., a v Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology (1989), Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.

Regulační elementy pro expresi molekul nukleové kyseliny podle vynálezu v rostlinné buňce jsou v principu jakýkoliv promotor, enhancer, terminátor apod., které jsou aktivní v rostlinné buňce. Promotor může být vybrán např. tak, že dochází ke konstitutivní expresi nebo k expresi jen v některých pletivech, nebo jen v určitém momentě vývoje rostlině nebo jen v určitém okamžiku determinovaném vnějšími faktory. Vzhledem k dané rostlině může být promotor buďto homologní nebo heterologní.

K vhodným promotorům patří např. 35S RNA promotor z viru mozaiky kvěťáku, CMV (viz např. patent US 5,352,605) a

ubiquitinový promotor (viz patent US 5,614,399) pro konstitutivní expresi, promotor patatinového genu B33 (Rocha-Sosa, EMBO J. 8 (1989), 23-29) pro expresi specifickou pro hlízy bramboru, nebo promotor, který zajišťuje expresi jen ve fotosynteticky aktivním pletivu, např. promotor ST-LS1 (Stockhaus, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7943-7947; Stockhaus, EMBO J. 8 (1989), 2445-2451), promotor Ca/b (viz např. patenty US 5,656,496, US 5,639,952, Bansal, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 3654-3658) a promotor genu malé podjednotky Rubisco SSU (viz např. US 5,034,322, US 4,962,028). Avšak mohou se užít i promotory, které jsou aktivovány jen v určitém čase v závislosti na vnějších podmínkách (viz např. WO 93/07279). V tomto směru jsou zejména zajímavé promotory proteinů tepelného šoku. Také se mohou užít promotory specifické pro semena, jako např. promotor USP z *Vicia faba*, které umožňují specifickou expresi v semenech *Vicia faba* i jiných rostlin (Fiedler, Plant Mol. Biol. 22 (1993), 669-679; Bäumlein, Mol. Gen. Genet. 225 (1991), 459-467). Kromě toho mohou být užity promotory specifické pro plody, jak byly např. popsány v mezinárodní patentové přihlášce WO 91/01373. Pro expresi v dozrávajících plodech rajčete jsou např. vhodné cis-regulační elementy polygalakturonázového promotoru, které jsou aktivní ve vnějším nebo vnitřním perikarpu (Nicholass a kol., Plant Mol. Biol. 28 (1995), 423-435; Montgomery a kol., Plant Cell 5 (1993), 1049-1062). Další promotor specifický pro plody u rajčete popsali Van Haaren a kol. (Plant Mol. Biol. 21 (1993), 625-640).

Kromě toho se mohou užít promotory pro expresi specifickou v endospermu, jako je např. promotor glutelinového genu (Leisy, Plant Mol. Biol. 14 (1990), 41-

50; Zheng, Plant J. 4 (1993), 357-366), promotor HMG pšenice, promotor USP. promotor fazeolinového genu nebo promotory zeinových genů z kukuřice (Pedersen, Cell 29 (1982), 1015-1026; Quattrocchio, Plant Mol. Biol. 15 (1990), 81-93) nebo promotor genu „shrunken-1“ (sh-1) kukuřice (Werr, EMBO J. 4 (1985), 1373-1380).

Expres molekul nukleové kyseliny podle vynálezu je zvláště výhodná v takových částech rostliny, které mají zvýšený obsah sacharózy. Takovými orgány jsou např. kořen cukrové řepy nebo stéblo cukrové třtiny nebo čiroku cukrového. Zvláště výhodné jsou proto promotory řídící expresi právě v těchto orgánech, jako je např. patatinový promotor B33 v *Solanum tuberosum*. Pro specifickou expresi ve stonku cukrové třtiny může být použit ubiquitinový promotor v kombinaci s prvním intronem.

Vektory podle vynálezu mohou obsahovat další funkční jednotky, které ovlivňují stabilitu vektoru v hostitelském organismu, jako je např. bakteriální replikační počátek nebo tzv. 2-mikron-DNA pro stabilizaci a autonomní replikaci v kvasinkách. Také mohou být přítomny sekvence „pravé hranice“ a „levé hranice“ z T-DNA z *Agrobacterium*, které dovolují stabilní integraci do genomu rostlin. Také mohou být přítomny terminační sekvence, které slouží ke správné terminaci transkripce nebo připojení poly-A konce k transkriptu, která má stabilizující funkci pro transkript. takové elementy jsou dostatečně popsány v odborné literatuře (např. Gielen, EMBO J. 8 (1989), 23-29) a jsou volně vyměnitelné.

Ve výhodném provedení molekula nukleové kyseliny obsažená ve vektoru podle vynálezu obsahuje úsek, který obsahuje funkční signální sekvenci pro sekreci kódovaného enzymu. Takové sekvence jsou známy. Příkladem signálního

peptidu, který dovoluje lokalizaci proteinu ve vakuole, je signální peptid karboxypeptidázy Y z kvasinky (CPY). Odpovídající gen byl popsán např. v Valls a kol. (Cell 48, 887-899). Rostlinné signální sekvence jsou např. signální sekvence z genu lektinu ječmene (Raikhel and Lerner, Dev. Genet. 12 (1991), 255-269) nebo sekvence 43 aminokyselin z N-koncového úseku fytohemaglutininu z fazolu (Tague a kol., Plant Cell 2 (1990), 533-546). Příkladem C-koncového signálního peptidu je signální peptid chitinázy (Neuhaus a kol., Plant J. 5 (1994), 45-54).

Výhodná signální sekvence je např. signální sekvence genu proteinázového inhibitoru II z bramboru. Avšak je možné vybrat jakoukoliv signální sekvence, která vede k sekreci daného polypeptidu ve vybraném hostiteli. Secernovaná fruktosyltransferáza se pak získává z kultivačního média a užívá se pro syntézy *in vitro*.

Ve zvláště výhodném provedení molekula nukleové kyseliny obsažená ve vektoru podle vynálezu obsahuje úsek, který obsahuje funkční signální sekvenci pro lokalizaci ve vakuole rostlinné buňky, výhodně jde o signální sekvenci patatinového genu z bramboru (Sonnewald, Plant. J. 1 (1998), 95-106). To umožňuje subcelulární lokalizaci fruktosyltransferázy ve vakuole geneticky modifikovaných rostlinných buněk a rostlin, např. cukrové řepy a bramboru, a tudíž akumulaci vysokomolekulární polyfruktózy inulínového typu ve vakuole. Další signální sekvence pro lokalizaci ve vakuole byly popsány např. v publikacích Matusoaka (Journal of Experimental Botany 50 (1999), 165-174), Chrispeels (Cell 68 (1992), 613-616), Matsuoka (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991), 834-838), Bednarek (Plant Cell 3 (1991), 1195-1206) a Nakamura (Plant Phys. 101 (1993), 1-5).

V jiném provedení předkládaného vynálezu molekula nukleové kyseliny obsažená ve vektoru podle vynálezu obsahuje úsek, který kóduje signální sekvenci pro lokalizaci v plastidu rostlinné buňky. Jako taková signální sekvence může být užita sekvence ferredoxin: NADP(+)-oxidoreduktázy (FNR) ze špenátu. Tato sekvence obsahuje 5'netranslatované úseky a také sousední sekvenci tranzitního peptidu sekvence cDNA plastidového proteinu NADP(+)-oxidoreduktázy (FNR) ze špenátu (nukleotidy -171 to +165; Jansen, Current Genetics 13 (1988), 517-522). Jako signální sekvence se také může užít transitní peptid voskovitého proteinu z kukuřice plus prvních 34 aminokyselin ze zralého voskového proteinu (Klösgen, Mol. Gen. Genet. 217 (1989), 155-161). Ve výhodném provedení vynálezu je užít transitní peptid voskového proteinu z kukuřice bez prvních 34 aminokyselin zralého proteinu.

Ve zvláště výhodném provedení se vynález týká plazmidů pSK-as1, p112-as1, pA7-as1, p35-as1, p35-s3-as1, jejichž konstrukce je popsána v příkladech (viz obr. 1 až 5).

Molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu a expresní vektory podle vynálezu dovolují produkci polyfruktóz inulínového typu v různých hostitelských organismech, zejména v rostlinách, bakteriích a houbách. Kódované enzymy se mohou užít i mimo hostitelský organismus k produkci polyfruktóz inulínového typu. To znamená, že je zejména možné použít molekuly nukleových kyselin podle vynálezu k přípravě proteinů jimi kódovaných v jakémkoliv hostiteli, aby se z hostitelských buněk získal protein a/nebo kultivační médium, které se pak užijí pro *in vitro* syntézu inulínu.

Tak např. konstrukt, který obsahuje promotor alkoholdehydrogenázy a molekulu nukleové kyseliny podle vynálezu se užije pro transformaci *Saccharomyces cerevisiae*.

Jelikož kvasinky nejsou schopny přijímat sacharózu, užijí se buňky, které exprimují přenašeč sacharózy díky vnesené heterologní sekvenci DNA. Příprava takových buněk byla popsána např. v publikaci Riesmeier a kol. (EMBO J. 11 (1992), 4705-4713). Kvasinky transformované výše popsaným konstruktem vytvářejí polyfruktózy s dlouhým řetězcem inulínového typu. Jelikož fruktosyltransferáza z *Aspergillus sydowi* neobsahuje signální peptid, není secernována. Polyfruktózy s dlouhým řetězcem se tudíž tvoří uvnitř kvasinkové buňky. Tyto kvasinky obsahující polyfruktózy mohou být užity přímo jako přísada do krmiva. Pokud mají být polyfruktózy získávány z kultivačního média, musí se molekula nukleové kyseliny podle vynálezu fúzovat se signální sekvencí, aby došlo k sekreci.

V dalším provedení se předkládaný vynález týká hostitelských buněk přechodně nebo trvale obsahujících molekuly nebo vektory podle vynálezu nebo z nich odvozených buněk. Termín "hostitelské buňky" se týká organismu, který je schopen *in vitro* přijmout rekombinantní DNA a případně syntetizovat proteiny kódované molekulami nukleové kyseliny podle vynálezu. Hostitelské buňky jsou prokaryotického nebo eukaryotického původu. Termín "prokaryotický" zahrnuje všechny bakterie, které mohou být transformovány nebo transfekovány molekulou nukleové kyseliny podle vynálezu a výhodně umožňují expresi proteinu s fruktosyltransferázovou aktivitou. K prokaryotickým hostitelským buňkám patří jak gram-negativní tak i gram-pozitivní bakterie jako např. *E. coli*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens* a *Bacillus subtilis*. Termín "eukaryotický" zahrnuje buňky hmyzu, hub, rostlin, zvířat nebo lidí. Výhodné jsou buňky z hub, např. takové, které se mohou užít pro fermentaci jako např.

Saccharomyces, zvláště výhodně buňky *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* apod. Výhodně jsou houbové buňky z hub rodu *Aspergillus* a zvláště výhodně z druhu *Aspergillus niger*. Zvláště zajímavá je exprese fruktosyltransferázy podle vynálezu v těchto buňkách v kombinaci se sekretorickou signální sekvencí, např. signální sekvencí patatinového genu nebo genu 1-SST z *Aspergillus foetidus* (Rehm a kol., J. Bac. 180 (1998), 1305-1319), která umožňuje sekreci fruktosyltransferázy do média. Výhodně se užijí buňky, které mají sníženou nebo nemají žádnou aktivitu secernovanou invertázovou aktivitu. K druhům hub, které nemají vlastní invertázovou aktivitu, patří např. *Trichoderma reesei*. Protokol pro expresi β -fruktofuranosidázy (invertázy z *A. niger*) byl popsán např. v Bergés a kol. (Curr. Genet. 24 (1993), 53-59).

Molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu, které kódují protein s fruktosyltransferázovou aktivitou, nebo odpovídající vektor, mohou být vneseny transfekcí nebo transformací do hostitelských buněk, a sice metodami, které jsou odborníkům známy. Postupy, jak připravit fúzní, operativně spojené geny a exprimovat je ve vhodných hostitelských buňkách jsou odborníkům známy a byly popsány např. v publikacích Sambrook a kol. nebo Ausubel a kol. (viz výše). Výhodné hostitelské buňky jsou buňky *E. coli*, hub, zejména kvasinek, a také rostlinné buňky.

Buňky podle vynálezu jsou výhodně charakterizovány tím, že vnesená nukleová kyselina je heterologní vzhledem k transformované buňce, tzn. že se přirozeně v této buňce nevyskytuje, nebo že je lokalizována v lokusu genomu odlišném od lokusu odpovídající přirozeně se vyskytující sekvence.

Když je molekula nukleové kyseliny podle vynálezu

exprimována v rostlině, obecně je možné, aby syntetizovaný protein byl přítomen v kterémkoliv kompartmentu rostlinné buňky. Aby bylo dosaženo lokalizace ve specifickém kompartmentu, molekula nukleové kyseliny podle vynálezu se spojí s DNA sekvencí, která zajistí lokalizaci do požadovaného kompartmentu, jak již bylo popsáno výše. Takové sekvence jsou odborníkům známy (viz např. Braun, EMBO J. 11 (1992), 3219-3227; Wolter, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 846-850; Sonnewald, Plant J. 1 (1991), 95-106; Rocha-Sosa, EMBO J. 8 (1989), 23-29).

K hostitelům podle vynálezu tedy patří buňky transgenních rostlin, rostlinná pletiva a celé rostliny, které jsou transformované jednou nebo několika nukleovými kyselinami podle vynálezu, a také transgenní rostlinné buňky, které pocházejí z takto transformovaných buněk. Tyto buňky obsahují jednu nebo několik molekul nukleové kyseliny podle vynálezu, které jsou výhodně spojeny s DNA regulačními elementy, které umožňují transkripci v rostlinné buňce, zejména promotory. takové buňky mohou být odlišeny od přirozeně se vyskytujících rostlinných buněk tím, že obsahují alespoň jednu nukleovou kyselinu podle vynálezu, která se přirozeně nevyskytuje v takové buňce, nebo se liší tím, že taková molekula je lokalizována v lokusu genomu buňky, kde v přirozeném stavu lokalizována není, tj. je v jiném genomickém prostředí.

Ještě v jiném provedení vynálezu se předkládaný vynález týká rostlinných buněk obsahujících v cytosolu protein podle vynálezu. Pro toto provedení vynálezu se užije sekvence uvedená zde jako sekvence id. č. 2 bez dalších signálních sekvencí.

V jiném výhodném provedení se předkládaný vynález týká

roślinných buněk obsahujících protein podle vynálezu v plastidech. Aby byl protein podle vynálezu nasměrován do plastidu, molekula nukleové kyseliny nebo vektor podle vynálezu se modifikují výše popsaným způsobem.

Jelikož vakuola je obvykle schopna skladovat velká množství sacharózy, která slouží proteinu podle vynálezu jako substrát, tento kompartment je perfektně vhodný k tomu, aby byly vytvořeny rostlinné buňky, které díky aktivitě proteinu podle vynálezu tvoří polyfruktózu ve vakuole.

Ve zvláště výhodném provedení se předkládaný vynález týká rostlinných buněk obsahujících ve vakuole protein podle vynálezu. Bylo již vysvětleno výše, jak je třeba konstruovat molekuly nukleové kyseliny a vektory podle vynálezu, aby bylo dosaženo lokalizace proteinu podle vynálezu ve vakuole.

Transgenní rostlinné buňky a rostlinná pletiva se mohou regenerovat na celé, úplné rostliny metodami, které jsou odborníkům známy. Rostliny získané regenerací transgenních rostlinných buněk podle vynálezu jsou také předmětem předkládaného vynálezu. Dalším předmětem vynálezu jsou rostliny obsahující výše popsané transgenní rostlinné buňky. Rostliny podle vynálezu jsou obecně jakékoliv rostliny, výhodně jednoděložné nebo dvouděložné rostliny. Výhodně rostlinné buňky pocházejí z hospodářsky významných rostlin, tj. rostlin, které člověk pěstuje protože poskytují potraviny nebo jako technické, zejména průmyslové využití. Výhodně se vynález týká rostlin produkujících vlákna (např. len, konopí, bavlník), olejin (např. řepka, slunečnice, sója), akumulujících cukry (např. cukrová řepa, cukrová třtina, cukrový čirok, banány) a akumulujících proteiny (např. luštěniny).

V jiném výhodném provedení se vynález týká píce

(např. krmných nebo píceňích trav, vojtěšky, jetele a pod.), zeleniny (např. melouny, rajče, banány, čekanka, pór, chřest, karotka) nebo rostlin akumulujících škrob (pšenice, ječmen, oves, žito, brambory, kukuřice, rýže, hrách, maniok, fazole mungo).

V dalším provedení vynálezu se vynález týká rostlinných buněk z rostlin obsahujících sacharózu (např. cukrová řepa, brambory, rýže, pšenice, cukrová třtina apod.). zejména výhodné jsou cukrová řepa, čekanka, rýže, kukuřice, brambory, cukrová třtina a pšenice. Vynález se také týká rozmnořovacího materiálu a sklizňových produktů z rostlin podle vynálezu, např. plodů, semen, hlíz, kořenových řízků, semenáčků, řízků, kalusů, buněčných kultur a pod.

Předkládaný vynález se také týká způsobu přípravy transgenních rostlin, kdy

a) rostlinná buňka se geneticky modifikuje vnesením molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu a/nebo vektoru podle vynálezu,

b) z buňky se regeneruje rostlina, a případně

c) z rostliny v bodě b) se regenerují další rostliny.

Termín "geneticky modifikovaná" podle předkládaného vynálezu znamená, že rostlinná buňka je modifikovaná ve své genetické informaci tím, že do ní byla vnesena molekula nukleové kyseliny podle vynálezu a že přítomnost nebo exprese nukleové kyseliny podle vynálezu vede k fenotypové modifikaci. Fenotypová modifikace výhodně znamená detekovatelnou modifikaci jedné nebo více funkcí buňky. Tak např. geneticky modifikované rostliny podle vynálezu vykazují aktivitu proteinu podle vynálezu nebo zvýšenou fruktosyltransferázovou aktivitu.

Rostliny se mohou regenerovat podle kroku b) metodami,

Předkládaný vynález se týká také rostlin získatelných způsobem podle vynálezu.

V jiném provedení se vynález týká sklíditelných částí rostlin podle vynálezu, jako jsou např. pody, listy, zásobní kořeny, kořeny, květy, pupeny, výhonky nebo stonky, a výhodně semena nebo hlízy.

V dalším výhodném provedení se předkládaný vynález týká krmiva pro zvířata a/nebo potravin pro člověka, které obsahují sklíditelné části rostlin podle vynálezu, výhodně semena nebo hlízy.

Výhodně rostlinné části podle vynálezu po konzumaci mají výhodu, že vykazují příznivý účinek na zdraví člověka nebo zvířete ve srovnání s odpovídajícími částmi rostlin, které nebyly geneticky modifikovány podle vynálezu. To samé platí pro potraviny nebo krmiva podle vynálezu. Konzumace

potravin podle vynálezu vede u člověka např. ke zlepšení složení intestinální flóry, zejména ke zvýšení obsahu bifidobaktérií ve střevu, což má pozitivní účinek na lidské zdraví (Izzo, Trends in Food Science & Technology 9 (1998), 255-257). Tyto pozitivní účinky jsou výhodně profylaktické účinky nebo účinky podporující využití živin.

Dalším předmětem předkládaného vynálezu jsou způsoby přípravy hostitelských buněk, kdy jsou vhodné hostitelské buňky transformovány molekulou nukleové kyseliny podle vynálezu nebo vektorem podle vynálezu. Způsoby transformace různých hostitelských buněk jsou odborníkům známy.

V dalším provedení se předkládaný vynález týká způsobů produkce fruktosyltransferázy, kdy se hostitel podle vynálezu kultivuje ve vhodných podmínkách pro expresi molekul nukleové kyseliny podle vynálezu a z kultury se pak izoluje fruktosyltransferáza, např. z buněk a/nebo případně kultivačního média. Ve výše zmíněných způsobech podle vynálezu se transformované nebo transfekované hostitelské buňky kultivují např. ve fermentoru, dokud není dosaženo optimální hustoty. Případně je, v případě indukovatelného promotoru, exprese proteinu kódovaného molekulou nukleové kyseliny podle vynálezu indukována pouze na konci fermentační fáze. Protein exprimovaný tímto způsobem může být purifikován z média, buněčných lyzátů nebo frakce buněčných membrán známými metodami. Proteiny, které byly takto exprimovány, např. v mikroorganismech, se izolují a purifikují preparativní chromatografií nebo imunologickými purifikačními metodami, např. užitím monoklonálních nebo polyklonálních protilátek, které rozpoznávají protein kódovaný nukleovou kyselinou podle vynálezu. V této souvislosti je třeba zmínit, že protein s fruktosyltransferázovou aktivitou, který je

kódován molekulou nukleové kyseliny podle vynálezu, může obsahovat další funkční aminokyselinové sekvence, např. proteinové značky (GST, GFP, Flag, HA peptide, His-tag) , pocházející z heterologních proteinů nebo synteticky připravené.

Předkládaný vynález se dále týká proteinů, které mají fruktosyltransferázovou aktivitu, tj. fruktosyltransferáz kódovaných molekulou nukleové kyseliny podle vynálezu nebo získatelných způsobem podle vynálezu. Fruktosyltransferázy podle vynálezu se výhodně užívají k výrobě polyfruktóz inulínového typu. Mohou se užít také pro přípravu protilátek, které jsou vhodné k detekci a/nebo purifikaci fruktosyltransferáz.

Dalším předmětem vynálezu jsou molekuly nukleové kyseliny, které specificky hybridizují s molekulami nukleových kyselin podle vynálezu nebo jejich fragmenty. Tyto molekuly jsou výhodně oligonukleotidy dlouhé alespoň 10, výhodně 15 a zvláště výhodně alespoň 50 nukleotidů. Tyto oligonukleotidy podle vynálezu se mohou užít např. jako primery pro PCR (polymerázovou řetězovou reakci) nebo jako hybridizační sondy.

Ještě dalším předmětem předkládaného vynálezu jsou způsoby výroby polyfruktóz, zvláště polyfruktóz inulínového typu, kdy hostitelské buňky podle vynálezu, nebo hostitelské organismy, které je obsahují, jsou kultivovány v podmínkách, které umožňují expresi fruktosyltransferázy podle vynálezu a také syntézu polyfruktózy.

Užitím molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu je umožněno produkovat, a sice metodami genové technologie, polyfruktózy, zejména polyfruktózy inulínového typu, v takových organismech, ve kterých to dosud při použití

konvenčních metod nebylo možné. Takže je možné exprimovat molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu v hostiteli jako jsou např. bakterie, houby nebo rostlinné buňky, aby se zvýšila aktivita odpovídající fruktosyltransferázy nebo aby se fruktosyltransferáza vnesla do buněk, kde normálně tento enzym není exprimován. Díky expresi nebo dodatečné expresi alespoň jedné molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu hostitelská buňka podle vynálezu syntetizuje polyfruktózu, zejména polyfruktózu inulínového typu. Dalším předmětem předkládaného vynálezu jsou proto polyfruktózy, zejména inulínového typu, získatelné z hostitelských buněk podle vynálezu nebo získatelné z rozmnožovacího materiálu a nebo v případě rostlin, získatelné z rostlin nebo sklíditelných rostlinných produktů.

Předkládaný vynález se tudíž zejména týká způsobu výroby polyfruktóz, zvláště polyfruktóz inulínového typu, který obsahuje kroky, kdy:

- a) kultivují hostitelské buňky podle vynálezu, nebo hostitel obsahující tyto buňky, v podmínkách, které dovolují produkci fruktosyltransferáz a reakci se sacharózou, případně dodanou z vnějšího prostředí buňky, nebo substrátem ekvivalentním polyfruktózám inulínového typu, a
- b) polyfruktózy takto produkovaná se získají z kultivovaných hostitelských buněk, hostitelských organismů nebo z média.

Hostitelské buňky jsou výhodně rostlinné buňky a hostitelem jsou výhodně rostliny. Způsob získání polyfruktóz, zejména inulínového typu, z rostlin byl popsán např. v publikaci Vogel (in: Inulin and Inulin-containing Crops,

Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, A. Fuchs (Ed.) (1993), 65-75).

Dalším předmětem předkládaného vynálezu je *in vitro* způsob produkce polyfruktóz, zejména inulínového typu, který obsahuje kroky, kdy:

- a) sacharóza nebo ekvivalentní substrát se přivede do kontaktu s fruktosyltransferázou podle vynálezu v podmínkách, které dovolují konverzi na polyfruktózu,
- b) polyfruktóza takto připravená se získá.

Substrát ekvivalentní sacharóze je např. substrát, který je konvertován na sacharózu hostitelskou buňkou nebo jedním nebo více dalšími enzymy. K substrátům ekvivalentním sacharóze patří např. také di- nebo oligosacharidy, které alternativně mohou být užity jako substráty pro fruktosyltransferázu podle vynálezu. Příkladem takových cukrů je např. trisacharid rafinóza. Ale lze užít i derivatizovanou sacharózu. Výhodně inulín získaný výše popsaným způsobem je inulín s dlouhým řetězcem a výhodně má stupeň polymerizace $DP > 20$, výhodně $DP > 50$, zejména $DP > 100$, a zvláště výhodný stupeň polymerizace je $DP > 200$.

Předkládaný vynález se dále týká způsobů výroby polyfruktóz, zvláště inulínového typu, obsahujících krok, kdy se polyfruktóza extrahuje z jedné výše popsané rostlin/rostlinných buněk podle vynálezu nebo z části rostlin podle vynálezu. Výhodně tyto způsoby obsahují krok sklizení pěstovaných rostlin a/nebo jejich částí před tím, než se provede extrakce polyfruktóz a zvláště výhodně krok pěstování těchto rostlin podle vynálezu před tím, než se sklídí. Vlastní způsoby extrakce polyfruktóz z rostlin nebo částí rostlin jsou odborníkům známy a byly popsány v odborné literatuře (Gibson, International Sugar Journal 96 (1994),

381-387), Vogel, Stud. Plant Sci. 3 (1993), Inulin and Inulin-Containing Crops, 65-75).

Předkládaný vynález se také týká polyfruktóz, zejména polyfruktóz inulínového typu, které jsou získatelné z hostitelských buněk podle vynálezu způsobem podle vynálezu, jak byly popsány výše. Polyfruktózy se výhodně užívají k výrobě surfaktantů, pro zvýšení viskozity vodných systémů, jak detergenty, suspenzní činidla, pro urychlení sedimentace a vytváření komplexů, nebo aby vázaly vodu.

Hostitelské buňky podle vynálezu, které syntetizují polyfruktózu, zvláště polyfruktózu inulínového typu, se mohou užít jako potravinové nebo krmivové doplňky. Takové užití je výhodné, neboť fruktany mají pozitivní účinek na zdraví (Roberfroid a kol., J. of Nutrition 128 (1998), 11-19; Kleesen a kol., Am. J. Clin. Nutr. 65 (1997), 1397-1402).

Předkládaný vynález se dále týká způsobu produkce polyfruktózy, zvláště inulínového typu, kdy se pro produkci polyfruktózy užije fruktosyltransferáza z houby nebo hostitelský organismus exprimující fruktosyltransferázu z houby. Výhodně se užije fruktosyltransferáza podle vynálezu nebo hostitelské buňky podle vynálezu. Předkládaný vynález poprvé ukázal, že je možné užít fruktosyltransferázu z houby k produkci polyfruktózy inulínového typu.

Nakonec se předkládaný vynález týká i použití fruktosyltransferázy z houby pro výrobu polyfruktózu, zejména polyfruktózu inulínového typu.

Odborníkovi je zřejmé, že tato a ještě další provedení vynálezu jsou zde popsána a jsou zahrnuta do popisu a příkladů předkládaného vynálezu. Další odborná literatura týkající se použitých metod a médií pro použití podle vynálezu může být nalezena ve stavu techniky ve veřejných

knihovnách a např. na elektronických médiích. Pro tento účel lze využít např. veřejně přístupné databáze jako je např. "Medline", která je přístupná prostřednictvím internetu např. na adrese: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html>. Další databáze a adresy jsou odborníkům známy a lze je najít na internetu např. na adrese: <http://www.lycos.com>. Přehled informačních zdrojů týkajících se biotechnologických patentů nebo patentových přihlášek uvádí Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364.

Přehled výkresů

Obr. 1 ukazuje konstrukci vektoru pSK-as1 pro transformaci bakterií.

Obr. 2 ukazuje konstrukci vektoru p112-as1 pro transformaci kvasinkových buněk.

Obr. 3 ukazuje konstrukci vektoru pA7-as1 pro transformaci rostlinných buněk.

Obr. 4 ukazuje konstrukci plazmidu p35-as1 pro transformaci rostlin.

Obr. 5 ukazuje konstrukci plazmidu p35-s3-as1 pro transformaci rostlin.

Obr. 6 ukazuje analýzu chromatografií na tenké vrstvě *E. coli* transformované pSK-as1. Dráha 1 je kontrolní pokus a vektorem bez inzertu pBluescript SK. Dráha 2 ukazuje experiment

s plazmidem pas1, kde kódující úsek as1 není ve shodném čtecím rámci s genem lacZ. V tomto případě nedochází k translaci kódujícího úseku as1 ve formě fúze s β -glukuronidázou, ale probíhá se sníženou účinností z endogenního startovacího kodonu. Dráhy 3 až 6 ukazují experimenty s různými transformanty konstruktu pSK-as1. Po nárůstu bakterií do OD_{600} 0,4 byly kultury indukovány 100 mM IPTG. Po dvouhodinové indukci byly buňky sklizeny a lyzovány v 50 mM fosforečnanu sodném s pH 6,0. Proteinové extrakty pak byly inkubovány 12 hodin s 600mM sacharózou ve 37 °C. Jako standardy pro chromatografii na tenké vrstvě byly v drahách 7 až 9 užity 1-kestóza (7), sacharóza (8) a fruktóza (9).

Obr. 7 ukazuje analýzu chromatografií na tenké vrstvě transformovaných kvasinkových buněk obsahujících plazmid p112-as1 (dráha 2) nebo p112-as1L (dráha 3). Vektor p112-as1L obsahuje 5'-vedoucí sekvenci přenašeče (transportéru) sacharózy ze špenátu. Dráha 1 ukazuje kontrolní experiment s netransformovanými kvasinkami. fruktosyltransferázová aktivita byla detekována v proteinových extraktech z kvasinkových buněk. Jako standard byly užity fruktóza (dráha 4), směs 1-kestózy, nystózy a fruktosyl-nystózy (dráha 5) a sacharóza (dráha 6).

Obr. 8 ukazuje analýzu chromatografií na tenké vrstvě rostlinných buněk obsahujících plazmid pA7-as1. Dráha 1 ukazuje transformaci vektorem bez inzertu pA7 (50 μ g); dráhy 2 až 5 ukazují transformaci vektorem pA7-as1 (dráha 2: 10 μ g; dráha 3: 20 μ g; dráhy 4 a 5: 50 μ g). Jako standard byly užity směs 1-kestózy, nystózy a fruktosyl-nystózy (dráha 6),

sacharóza (dráha 7) a fruktóza (dráha 8). V každém experimentu bylo užito 500,000 protoplastů. Protoplasty byly po transformaci inkubovány dva dny při 25 °C, pak byly proteinové extrakty získány v 50 mM fosforečnanu sodném s pH 6,0. a proteinové extrakty pak byly inkubovány 20 hodin s 500mM sacharózou ve 28 °C. Byly nanесeny 4 μl při ředění 1/10.

Obr. 9 ukazuje analýzu chromatografií na tenké vrstvě rostlin transformovaných konstruktem 35-as1. Náhodným způsobem bylo vybráno 12 rostlin. 20 mg listové hmoty bylo extrahováno ve 200 μl vody, pak byly nanесeny 4 μl extraktu. Jako standard byly užity fruktóza (dráha F), sacharóza (dráha S) a směs 1-kestózy, nystózy a fruktosyl-nystózy (dráha St).

Obr. 10 ukazuje analýzu chromatografií na tenké vrstvě rostlin transformovaných konstruktem 35-S3as1. Náhodným způsobem bylo vybráno 12 rostlin. 20 mg listové hmoty bylo extrahováno ve 200 μl vody, pak byly nanесeny 4 μl extraktu. Jako standard byly užity fruktóza (dráha F), sacharóza (dráha S) a směs 1-kestózy, nystózy a fruktosyl-nystózy (dráha St).

Obr. 11 ukazuje eluáty "400 až 0 mM síranem amonným" z kolony s fenylsuperose, na kterou byl nanесen proteinový extrakt z *Aspergillus sydowi* obohacené fruktosyltransferázou (dráha E). V drahách označených M je marker velikostí. Molekulární hmotnosti markerových proteinů jsou ukázány vpravo v kDa.

Předkládaný vynález je ilustrován následujícími

příklady.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Purifikace afl-SST z *Aspergillus sydowi*

Aspergillus sydowi IAM 2544 byl kultivován na médiu obsahujícím 2% sladový extrakt, 0,5% pepton a 2% sacharózu. Médium bylo zpevněno přidáním 2 % agaru. Spóry byly vysety a kultura byla udržována při 25 °C, dokud plotny nebyly úplně suché. Konidie byly sklizeny z ploten a rozpuštěny v 50mM hydrogenfosforečnanu sodném s pH 6,0. Lýze konidií byla provedena trojitým průchodem Francouzskou tlakovou komůrkou. Pro purifikaci byl homogenát adsorbován na Sepharózu Q. navázaný protein byl eluován lineárním gradientem 0 až 1000 mM KCl. Sacharózolytické frakce byly získány mezi 500 a 700 mM KCl. Tyto frakce byly sloučeny a dialyzovány proti hydrogenfosforečnanu sodnému s pH 6,0. Pro obohacení proteinu se opakovala adsorpce na Sepharose Q (objem lože 2 ml) a eluce do objemu 10 ml. Eluát byl upraven na 2M síran amonný a adsorbován na fenylsuperose. Po propláchnutí 2M síranem amonným byla provedena eluce 100 mM hydrogenfosforečnanem sodným s pH 7,0 a lineárním gradientem 2M až 0M síranu amonného. Aktivní frakce byly získány v elučním gradientu mezi 400 a 0 mM síranem amonným. Získaná proteinová směs byla analyzována na SDS-PAGE. Výsledky jsou ukázány na obr. 11. Podobné obohacená sacharózolytickou aktivitou bylo popsáno, avšak s mycéliem *Aspergillus sydowi*,

v publikaci Muramatsu a Nakakuki (Biosci Biotech Biochem 59 (1995), 208-212). Purifikace neposkytla homogenní protein, který by byl vhodný např. pro sekvencování.

Pro identifikaci fruktosyltransferázy byl použit seminativní polyakrylamidový gel, na který byly nanесeny vzorky obsahující 10 µg protein z eluátu z fenylsuperosové kolony v 0,1% SDS, 10% glycerolu a 50mM Tris pH 6,8. Po elektroforéze byl gel znovu pufrován třikrát po 10 minutách v 50mM hydrogenfosforečnanu sodném pH 6,0, 1 % Triton X100 a pak inkubován 30 minut v 50mM hydrogenfosforečnanu sodném pH 6,0, 1 % Triton X100 a 500 mM sacharóza. Gel byl pak povařen v 0,1% (hmot./objem) 2,3,5,-trifenyl-tetrazoliumchlorid (TTC), 0,5 M NaOH. TTC za těchto podmínek vytváří červené formazanové barvivo společně s redukovanými cukry. Označený protein pás na obr. 11 vznikl v důsledku sacharózolytické aktivity proteinu, který byl tímto identifikován jako fruktosyltransferáza z *Aspergillus sydowi*. Pás byl izolován z preparativního gelu, protein byl z gelu eluován a použit pro sekvencování. Jelikož je protein N-koncově blokován, byla provedena štěpení endopeptidázami LysC a AspN, peptidy byly purifikovány na HPLC a pak podrobeny sekvencování podle Edmana. Byly získány následující sekvence:

LysC: VLPSTSQASEK (sekvence id. č. 3)

AspN: DDLVTYR (sekvence id. č. 4)

DPYVFQNHEV (sekvence id. č. 5)

Pro klonování genu byla zkonstruována cDNA knihovna ve fágu Lambda Zap II (Stragene, Heidelberg). Jelikož nebylo možné připravit RNA z konidií, byla RNA připravena z mycélia

postupem podle Logemann a kol. (Anal. Biochem. 163 (1987), 16-20). Poly A⁺-RNA byla získána užitím soupravy polyAtract System (Promega, Madison, USA). Syntéza cDNA a klonování do Lambda Zap II byly provedeny postupem podle pokynů výrobce soupravy (Stratagene, Heidelberg). Ve shodě s proteinovou sekvencí byly připraveny následující oligonukleotidové primery:

Primer asp19down:

5'-GAYGAYYTNGTNACNTAYMG (sekvence id. č. 6)

Primer asp19up:

5'-CKRTANGTNACNARRTCRTC (sekvence id. č. 7)

Primer asp31-down:

5'-GTNTTYCARAAYCAYGARG (sekvence id. č. 8)

Primer asp31up:

5'-TGRTTYTGRAANACRTANGG (sekvence id. č. 9)

Primer lys1up:

5'-GCYTGNSWNGTNSWNGG (sekvence id. č.10)

V PCR reakci s celou cDNA knihovnou jako templátem a kombinací primerů asp19down/asp31up (teplota pro nasednutí primerů 40 °C) byl získán fragment velikosti 350 bp. Tento fragment byl po radioaktivním označení (Megaprime Kit, Boehringer Mannheim, Mannheim) použit pro screening cDNA knihovny. Získané klony byly amplifikovány po vystřižení *in vivo* jako plazmidy pBluescript. cDNA inzerty byly porovnány

po restrikčním štěpení a inzerty klonu byly plně sekvencovány. Sekvence cDNA inzertů je uvedena jako sekvence id. č. 1. Odvozená sekvence proteinu je uvedena jako sekvence id. č. 2.

Příklad 2

Příprava konstruktů obsahujících kódující úseky fruktosyltransferázy z hub vhodných pro transformaci různých prokaryotických a eukaryotických hostitelských buněk

Pro transformaci různých hostitelských buněk fruktosyltransferázou z hub byla připravena řada konstruktů metodami, které jsou v oboru molekulární biologie známé (Sambrook a kol., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Konstrukty jsou uvedeny na obr. 1 až 5. Konkrétně byly konstrukty připraveny následujícím způsobem:

- pSK-as1 je derivát pas1, který byl získán vystřižením *in vivo* z klonu Lambda Zap II cDNA knihovna *Aspergillus sydowi*. pas1 obsahuje cDNA jakožto fragment EcoRI/XhoI. pSK-as1 byl připraven z pas1 štěpením BamHI a SmaI, doplněním kohezivního konce BamHI a znovuspojením vektoru. Odstraněním 4 nukleotidů z kódujícího úseku as1 vedlo k "přepojení" na čtecí rámec genu lacZ (Obr. 1).
- p112-as1 Do vektoru p112A1NE (viz Riesmeier a kol., EMBO J. 11 (1992), 4705-4713), který byl štěpen BamHI, doplněn a pak štěpen NotI, byl klonován fragment as1 z pas1 (štěpeného Asp718, doplněného a pak znovu štěpeného NotI) (Obr. 2).
- pA7-as1 byl připraven z pA7 klonováním kódujícího úseku z pas1 jako fragmentu SmaI/Asp718, jehož kohezivní konce byly doplněny, do doplněných míst Asp718 a SmaI ve vektoru. Správná orientace fragmentu ve vektoru byla potvrzena štěpením HindIII, které

poskytlo fragment velikosti přibližně 1900bp. pA7 je derivát pUC18, který obsahuje mezi místy EcoRI a Asp718 promotor 35S RNA z viru mozaiky kvěťáku (CaMV; 528 bp; nt 6909-7437, Franck a kol., Cell 21 (1980), 285-294), a mezi místy SphI a HindIII terminátor z genu oktopinsyntázy z *Agrobacterium tumefaciens* (Gielen a kol., EMBO J. 3 (1984), 835-846) (Obr. 3).

p35-as1 byl připraven z pBinAR ligací fragmentu as1 z pas1 (štěpeného Asp718/NotI a pak doplněného) do vektoru, který byl štěpen SmaI. pBinAR je derivát pBin19 (Bevan, Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711), který obsahuje mezi místy EcoRI a Asp718 promotor 35S RNA viru mozaiky kvěťáku (CaMV; 528 bp; nt 6909-7437, Franck a kol., tamtéž) a mezi místy SphI a HindIII terminátor z genu oktopinsyntázy z *Agrobacterium tumefaciens* (Gielen a kol., EMBO J. 3 (1984), 835-846) (obr. 4).

p35-s3-as1 byl klonován ve dvou krocích. Nejdříve byl fragment BamHI / Asp718 z pas1, jehož kohezivní konce byly zaplněny T4 polymerázou, byl klonován do vektoru pS3, který byl štěpen BamHI a pak doplněn. Tak byl získán pS3-as1. Vektor pS3 obsahuje PCR fragment z genu patatinu B33 (Rosahl a kol., Mol. Gen. Genet. 203 (1986), 214-220), obsahující nukleotidy 725 až 1400. PCR fragment je eopatřen restriční místem Asp718 (GGTACC) v poloze nt 725, sekvencí ATGG v poloze nt 1400, která v kombinaci s nt 1399 a 1400 poskytuje restriční místo NcoI. PCR fragment je vložen mezi restriční místa Asp718 a SmaI. Z pS3-as1 byl připraven

fragment *SacI* (zaplněno) / *XbaI*, který obsahuje fúzi *S3-as1*. Tento fragment byl klonován mezi restrikční místa *SmaI* a *XbaI* v *pBinAR* (Obr. 5).

Odpovídající hostitelé byli transformováni standardními postupy. *E. coli* byly transformovány postupem podle Hanahan (J. Mol. Biol. 166 (1983), 557-580), *Saccharomyces cerevisiae* byly transformovány podle Dohmen a kol. (Yeast 7 (1991), 691-692), transientní (dočasná) genová exprese v tabáku byla provedena postupem podle Damm and Willmitzer (Mol. Gen. Genet. 213 (1989), 15-20), trvala transformace brambor byla provedena postupem podle Dietze a kol. (in: Potrykus, I. and G. Spangenberg (Ed.). Gene transfer to plants. xxii+361 (1995), 24-29; Springer-Verlag: Berlin, Germany; New York, New York, USA. ISBN 3-540-58406-4).

Příklad 3

Analýza fruktosyltransferázové aktivity transgenních hostitelských buněk nebo organismů exprimujících houbovou fruktosyltransferázu

Syntéza inulinu *in vivo*

Transgenní hostitelské buňky nebo organismy, které exprimují houbovou fruktosyltransferázu, byly kultivovány v médiu s obsahem 2 % sacharózy - pokud se nejednalo o rostlinné pletivo. V případě, že hostitelským organismem byly bakterie *Escherichia coli* K12, funkční gen *cscB* kódující sacharózapermeázu z *E. coli* byl vnesen jako konstrukt do vektoru *pACYC184*. V případě *Saccharomyces*

cerevisiae byl vnesen do vektoru p112AINE (Riesmeier a kol., EMBO J. 11 (1992), 4705-4713) gen pro sacharózový přenašeč. Buňky pak byly kultivovány alespoň 24 hodin v přítomnosti sacharózy, pak sklizeny a po opláchnutí v 50 mM hydrogenfosforečnanu sodném s pH 6,0 rozrušeny.

Rostliny exprimující fruktosyltransferázu z houby byly pěstovány v půdě. Po čtyřech týdnech byly odebrány vzorky z listů i jiných pletiv a extrahovány ve vodě, 1 ml vody/1 g čerstvé hmotnosti vzorku, v přítomnosti nerozpustného polyvinylpolypyrrolidonu, a buněčné zbytky byly odstraněny centrifugací. 4 μ l každého extraktu bylo aplikováno na silikagel na již hotové DC filmy (Schleicher and Schüll, Dassel, Germany) a vyvinuty dvakrát ve směsi aceton/voda (87:13). Pak byl proveden test na fruktosylové zbytky s močovinou a kyselinou fosforečnou jako činidly (Röber a kol., Planta 199 (1992), 528-536).

Syntéza inulínu *in vitro*

Buňky exprimující fruktosyltransferázy z houby byly rozrušeny v pufru obsahujícím: 50 mM hydrogenfosforečnan sodný, pH 6,0, 50 μ M PMSF, 1 mM DTT, 10% (objem.) ethylenglykol. Buněčné extrakty byly inkubovány v pufru obsahujícím: 50 mM hydrogenfosforečnan sodný, pH 6,0, 500 mM sacharózu, 50 μ M PMSF, 1 mM DTT, 0.02% (hmot./objem) NaN_3 , 10% (objem.) ethylenglykol po 12 při 25°C. Směsi byly naředěny 1:10 ve vodě a pak 4 μ l byly naneseny na již hotové silikagelové DC filmy (Schleicher and Schüll, Dassel, Germany) a vyvíjeny dvakrát ve směsi aceton/voda (87:13). Pak byl proveden test na fruktosylové zbytky s močovinou a kyselinou fosforečnou jako činidly (Röber a kol., Planta 199

(1992), 528-536).

Výsledky jednotlivých analýz jsou uvedeny na obr. 6 až 10. Na těchto obrázcích jsou ukázány silikagelové filmy po chromatografii na tenké vrstvě směsí nebo buněčných homogenátů a barvení na cukry obsahující fruktózu. Pomocí chromatografie na tenké vrstvě ve směsi aceton/voda (87:13) se sacharidy, mono-, oligo- i polymery rozdělí podle velikosti. Fruktóza migruje dále než sacharóza, která zase naopak migruje dále než kestóza atd. Oligomery s $DP > 7$ a vyšším nejsou separovány a zůstávají na startu.

Na obr. 6 je vidět, že klony *E. coli* transformované vektorem pBluescript bez inzertu nejsou schopny přeměňovat sacharózu (dráha 1), zatímco klony transformované plazmidem pas1 syntetizují trisacharid kestózu. Klony transformované plazmidem pSK-as1 jsou také schopné syntetizovat vyšší oligomery (dráhy 3 až 6). Současně fruktózové zbytky jsou přenášeny na vodu, čímž se vytváří fruktóza. Tato přeměna je katalyzována SFT z *Aspergillus sydowi*.

Obr. 7 ukazuje, že proteinové extrakty z kvasinek transformovaných plazmidem 112-as1 mohou syntetizovat fruktan. Aktivita fruktosyltransferázy je v těchto kvasinkách vyšší než v kvasinkách transformovaných konstruktem 112-as1L. Tyto kvasinky, vzhledem k nižší fruktosyltransferázové aktivitě v průběhu času vymezeného pro experiment, syntetizovaly pouze trisacharidy. Velikost syntetizovaných fruktanů závisí na reakční době a na fruktosyltransferázové aktivitě.

Obr. 8 ukazuje, že velikost fruktanu syntetizovaného v extraktech z transformovaných tabákových protoplastů závisí při dané reakční době na fruktosyltransferázové aktivitě, což zase závisí na množství plazmidu pA7-as1 užitého pro

$\langle 210 \rangle$ 1

<211> 2197

<212> DNA

<213> *Aspergillus sydowi*

<400> 1

gaattcggca	cgaggccgcc	atgaagctcc	cctcttcaact	ggacattctt	ctcgccagac	60
aggcggttgg	cggtactgag	gtcgactacg	actcaccacc	ccctgacctg	acgacgctcc	120
ctgagaactc	gctgttcgag	acctggagac	ccaagatcca	cgttctgccc	ccaaatggcc	180
aaatcgggga	cccattgcgt	cattacaatg	acccggcgac	gggtttgttc	catgtcggat	240
tcctccacaa	tggcaccggc	atttccagcg	tctacaccga	tgacctggtg	acctatcgtg	300
atatcaatcc	taacggcggc	tacattattg	ttgctggtgg	ccccaatgac	cccgaagccg	360
tctttgatgg	atctgtcatc	cccagcggaa	tcgatgacct	gcccacgctc	ctttatacct	420
ctgtgacatc	gttgccaatc	cactggactc	taccttatac	ccccggaagc	gagactcagt	480
cactggccgt	aagtgacgat	ggtggtcacc	acttcgataa	gcttgaccga	ggcccagtc	540
ttccacttcc	gccagatgga	ctcgatgtta	cagccttccg	tgacccttat	gtattccaga	600
accacgaggt	agacgaagtt	accggtagt	accagatac	atggtatgcc	gccatatccg	660
ggggtgtcca	tgatgtaggg	ccggaatct	ttctctaccg	caaccaagac	tcctcctttg	720
agaactggga	atatctaggc	gagtgggtgg	aagaaccgc	caactcgact	tggggtgacg	780
gcacttgggc	caaacgctgg	ggctacaatt	tcgaaaccgg	caacgtcttc	tctctcgatc	840
gagaagggta	caacgttgac	ggccacacgt	ttatgactat	tggagttgag	ggtgcatacg	900
cgcccatcca	gccctcggtt	acatctatgc	atgccatgct	gtgggcagcg	ggaaatgttt	960
cctcagagaa	tggcgaaaac	gttaccttca	cgccttatat	ggccggtgct	ttggactggg	1020
gcattggccgc	atacgccggt	gctggaaagg	ttctacccag	cacatctcag	gcttctgaga	1080
agagtggagc	gcccgaccgc	ttcatctcgt	gggtttggct	tacaggtgat	gaatttggtg	1140
ctgccgctgg	atttcctgct	gccagcagg	ggtggcagaa	tactctcctg	cttcgcgctg	1200
aattgagtat	acacacaatc	cagaatgtgg	tcgacaacga	actcatccac	gagactgcat	1260
cctggcgtgt	ggcagaacat	ggcggcgaga	ggagatctgg	tgggtgctgag	ctggagacac	1320
tgggaatcaa	tattgcgagg	gagacctacg	atgcaatcgt	ctcttctggg	acctcgtttg	1380
aggagccttc	gcgagacatt	aatgaatccg	gcaccattcc	atttgagcgc	tcgcccacta	1440
gcaggttctt	cgcccttgaa	gccccaaatct	ccttccccca	gtctgcgcga	gactcggaag	1500
tcagtcccgg	atttcaaatc	cttgcttctg	aactcgagt	gacgacgatc	tattatcagt	1560
tttcgaatga	gtcgattgtc	attgaccgta	accacacaag	tgctgcgtcc	gagactacac	1620

ctggtctcgg	tactgtgact	gagtctggcc	gtatccggct	tttcgatatc	gcgggtgggt	1680
gcgatcatga	tggacatggc	ggccacgatg	gcggcaacga	tgatgaccac	aacggtgacg	1740
gtgatcatag	cggtgacggt	gaccacaatg	acgatgatga	ccataacgtc	gacggcgatg	1800
acaaggagcg	tgctcgttac	caaaagcgag	atggcccttg	cgataaagac	catgataagg	1860
ttgagacatt	ggatctcacc	attgtcgtcg	ataactcagt	gcttgaagtt	tacgccaaact	1920
cacgatttgt	ggtgtcgacc	tgggttcggc	cttggtacac	caattcaacg	gagatttcgct	1980
tcttccacaa	cggcgagggt	gaggtcagct	ttgacaacat	tgcggttcac	gatggtctgt	2040
atgatgcata	tccggacagg	gacaactgaa	gatttcactg	gttgatgtat	tagcttgcga	2100
gctataaaga	tggcgataat	tagtagattt	aatccaatga	attacctgcc	gagattgcag	2160
atttattctt	acaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	actcgag			2197

 $\langle 210 \rangle \quad 2$

<211> 682

<212> PRT

<213> *Aspergillus sydowi*

 $\langle 400 \rangle \quad 2$

Met Lys Leu Pro Ser Ser Leu Asp Ile Leu Leu Ala Arg Gln Ala Val
1 5 10 15

Gly Gly Thr Glu Val Asp Tyr Asp Ser Pro Pro Pro Asp Leu Thr Thr
20 25 30

Leu Pro Glu Asn Ser Leu Phe Glu Thr Trp Arg Pro Lys Ile His Val
35 40 45

Leu Pro Pro Asn Gly Gln Ile Gly Asp Pro Cys Ala His Tyr Asn Asp
50 55 60

Pro Ala Thr Gly Leu Phe His Val Gly Phe Leu His Asn Gly Thr Gly
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Tyr Thr Asp Asp Leu Val Thr Tyr Arg Asp Ile Asn
85 90 95

Pro Asn Gly Gly Tyr Ile Ile Val Ala Gly Gly Pro Asn Asp Pro Glu
100 105 110

Ala Val Phe Asp Gly Ser Val Ile Pro Ser Gly Ile Asp Asp Leu Pro
115 120 125

Thr Leu Leu Tyr Thr Ser Val Thr Ser Leu Pro Ile His Trp Thr Leu
130 135 140

Pro Tyr Thr Pro Gly Ser Glu Thr Gln Ser Leu Ala Val Ser Asp Asp
145 150 155 160

Gly Gly His His Phe Asp Lys Leu Asp Arg Gly Pro Val Ile Pro Leu
165 170 175

Pro Pro Asp Gly Leu Asp Val Thr Ala Phe Arg Asp Pro Tyr Val Phe
180 185 190

Gln Asn His Glu Val Asp Glu Val Thr Gly Ser Asp Pro Asp Thr Trp
195 200 205

Tyr Ala Ala Ile Ser Gly Gly Val His Asp Val Gly Pro Gly Ile Phe
210 215 220

Leu Tyr Arg Asn Gln Asp Ser Ser Phe Glu Asn Trp Glu Tyr Leu Gly
225 230 235 240

Glu Trp Trp Gln Glu Pro Ala Asn Ser Thr Trp Gly Asp Gly Thr Trp
245 250 255

Ala Lys Arg Trp Gly Tyr Asn Phe Glu Thr Gly Asn Val Phe Ser Leu
260 265 270

Asp Arg Glu Gly Tyr Asn Val Asp Gly His Thr Phe Met Thr Ile Gly
275 280 285

Val Glu Gly Ala Tyr Ala Pro Ile Gln Pro Ser Val Thr Ser Met His

000001

46

290	295	300
Ala Met Leu Trp Ala Ala Gly Asn Val Ser Ser Glu Asn Gly Glu Asn		
305	310	315 320
Val Thr Phe Thr Pro Tyr Met Ala Gly Ala Leu Asp Trp Gly Met Ala		
325	330	335
Ala Tyr Ala Gly Ala Gly Lys Val Leu Pro Ser Thr Ser Gln Ala Ser		
340	345	350
Glu Lys Ser Gly Ala Pro Asp Arg Phe Ile Ser Trp Val Trp Leu Thr		
355	360	365
Gly Asp Glu Phe Gly Ala Ala Ala Gly Phe Pro Ala Ala Gln Gln Gly		
370	375	380
Trp Gln Asn Thr Leu Leu Leu Pro Arg Glu Leu Ser Ile His Thr Ile		
385	390	395 400
Gln Asn Val Val Asp Asn Glu Leu Ile His Glu Thr Ala Ser Trp Arg		
405	410	415
Val Ala Glu His Gly Gly Glu Arg Arg Ser Gly Gly Val Glu Leu Glu		
420	425	430
Thr Leu Gly Ile Asn Ile Ala Arg Glu Thr Tyr Asp Ala Ile Val Ser		
435	440	445
Ser Gly Thr Ser Phe Glu Glu Pro Ser Arg Asp Ile Asn Glu Ser Gly		
450	455	460
Thr Ile Pro Phe Glu Arg Ser Pro Thr Ser Arg Phe Phe Ala Leu Glu		
465	470	475 480
Ala Gln Ile Ser Phe Pro Gln Ser Ala Arg Asp Ser Glu Val Gln Ser		
485	490	495

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> *Aspergillus sydowi*

<400> 3

Val Leu Pro Ser Thr Ser Gln Ala Ser Glu Lys

1 5 10

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> *Aspergillus sydowi*

<400> 4

Asp Asp Leu Val Thr Tyr Arg

1 5

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> *Aspergillus sydowi*

<400> 5

Asp Pro Tyr Val Phe Gln Asn His Glu Val

1 5 10

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Arteficiální sekvence
 <220>
 <223> Popis arteficiální sekvence: arteficiální sekvence
 <400> 6

gaygayytng tnacntaymg 20

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Arteficiální sekvence
 <220>
 <223> Popis arteficiální sekvence: arteficiální sekvence
 <400> 7

ckrtangtna cnarrtcrtc 20

<210> 8
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Arteficiální sekvence
 <220>
 <223> Popis arteficiální sekvence: arteficiální sekvence
 <400> 8

gtnttycara aycaygarg

19

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Arteficiální sekvence

<220>

<223> Popis arteficiální sekvence: arteficiální sekvence

<400> 9

tgrttytgra anacrtangg

20

<210> 10

<211> 17

<212> DNA

<213> Arteficiální sekvence

<220>

<223> Popis arteficiální sekvence: arteficiální sekvence

<400> 10

gcytgnswnng tnswnngg

17

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Molekula nukleové kyseliny kódující fruktosyltransferázu, která je vybrána ze skupiny obsahující:

a) molekuly nukleové kyseliny kódující protein obsahující aminokyselinovou sekvenci id. č. 2,

b) molekuly nukleové kyseliny obsahující nukleotidovou sekvenci kódujícího úseku uvedenou zde jako sekvence id. č. 1 nebo odpovídající ribonukleotidovou sekvenci,

c) molekuly nukleové kyseliny hybridizují s řetězcem komplementárním k molekulám nukleové kyseliny podle a) nebo b), a

d) molekuly nukleové kyseliny jejichž nukleotidová sekvence se liší od sekvence molekuly nukleové kyseliny podle c) v důsledku degenerace genetického kódu,

a k nim komplementární molekuly.

2. Molekula nukleové kyseliny podle nároku 1, která je DNA nebo RNA.

3. Molekula nukleové kyseliny podle nároku 1 nebo 2, která kóduje polypeptid z houby.

4. Molekula nukleové kyseliny podle nároku 3, kde houba je z rodu *Aspergillus*.

5. Vektor obsahující molekulu nukleové kyseliny podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4.

6. Vektor podle nároku 5, kde molekula nukleové kyseliny je operativně spojena s regulačními prvky, které zajišťují

transkripci a syntézu translatovatelné RNA v prokaryotických a/nebo eukaryotických buňkách.

7. Vektor podle nároku 6, kde molekula nukleové kyseliny obsahuje úsek, který kóduje signální sekvenci, která ovlivňuje intra- nebo extracelulární lokalizaci fruktosyltransferázy.

8. Hostitelské buňky transformované molekulou nukleové kyseliny podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4 nebo vektorem podle kteréhokoliv z nároků 5 až 7 nebo které pocházejí z takových buněk.

9. Hostitelská buňka podle nároku 8, která je bakteriální buňka nebo buňka houby.

10. Rostlinná buňka, která je transformovaná molekulou nukleové kyseliny podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4 nebo vektorem podle kteréhokoliv z nároků 5 až 7 nebo které pochází z takové buňky.

11. Způsob přípravy rostliny v y z n a č u j í c í s e tím, že obsahuje kroky, kdy:

a) rostlina se geneticky modifikuje vnesením molekuly nukleové kyseliny podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4 a/nebo vektoru podle kteréhokoliv z nároků 5 až 7, a

b) z buňky se regenerují rostliny, a případně

c) další rostliny se regenerují z rostliny podle b).

12. Rostlina obsahující rostlinné buňky podle nároku 10 nebo připravitelná způsobem podle nároku 11.

13. Rostlina podle nároku 12, která je užitková rostlina.
14. Rozmnožovací materiál rostliny podle nároku 12 nebo 13 obsahující rostlinné buňky podle nároku 10.
15. Skliditelné části rostliny podle nároku 12 nebo 13.
16. Krmivo pro zvířata nebo potraviny pro člověka v y z n a č u j í c í s e tím, že obsahují skliditelné části rostlin podle nároku 15.
17. Způsob přípravy hostitelských buněk podle nároku 8 nebo 9 v y z n a č u j í c í s e tím, že obsahuje krok, kdy vhodné buňky jsou transformovány molekulou nukleové kyseliny podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4 nebo vektorem podle kteréhokoliv z nároků 5 až 7.
18. Způsob výroby fruktosyltransferázy, v y z n a č u j í c í s e tím, že obsahuje krok, kdy se hostitelská buňka podle nároku 8 nebo 9 nebo rostlinná buňka podle nároku 10 kultivuje v podmínkách, které dovolují syntézu fruktosyltransferázy, a fruktosyltransferáza se izoluje z kultivovaných buněk a/nebo z kultivačního média.
19. Fruktosyltransferáza kódovaná molekulou nukleové kyseliny podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4 nebo připravitelná způsobem podle nároku 18.
20. Molekula nukleové kyseliny, která specificky hybridizuje s molekulou nukleové kyseliny podle kteréhokoliv z nároků 1

až 4 nebo s jejím komplementárním řetězcem.

21. Způsob výroby polyfruktózy, zvláště inulínového typu, v y z n a č u j í c í s e tím, že obsahuje kroky, kdy:

a) kultivují se hostitelské buňky podle nároku 8 nebo 9 nebo hostitel obsahující takové buňky v podmínkách, které dovolují produkci fruktosyltransferázy a přeměňující sacharózu případně přidanou nebo substrátový ekvivalent na polyfruktózu,

b) takto produkováná polyfruktóza se získá z kultivovaných buněk, hostitele nebo kultivačního média.

22. Způsob výroby polyfruktózy, zvláště inulínového typu, v y z n a č u j í c í s e tím, že obsahuje kroky, kdy:

a) sacharóza nebo ekvivalentní substrát se přivede do kontaktu s fruktosyltransferázou podle nároku 19 v podmínkách, které dovolují přeměnu na polyfruktózu, a

b) získá se takto produkováná polyfruktóza.

23. Způsob výroby polyfruktózy, zvláště inulínového typu, v y z n a č u j í c í s e tím, že obsahuje krok, kdy se polyfruktóza extrahuje z rostlinné buňky podle nároku 10, z rostliny podle nároku 12 nebo 13 nebo z části takové rostliny.

24. Způsob výroby surfaktantů v y z n a č u j í c í s e tím, že obsahuje kroky a) a b) podle nároku 21 nebo 22 nebo extrakční krok podle nároku 23.

25. Použití hostitelských buněk podle nároku 8 nebo 9 nebo rostlinných buněk podle nároku 10 jako

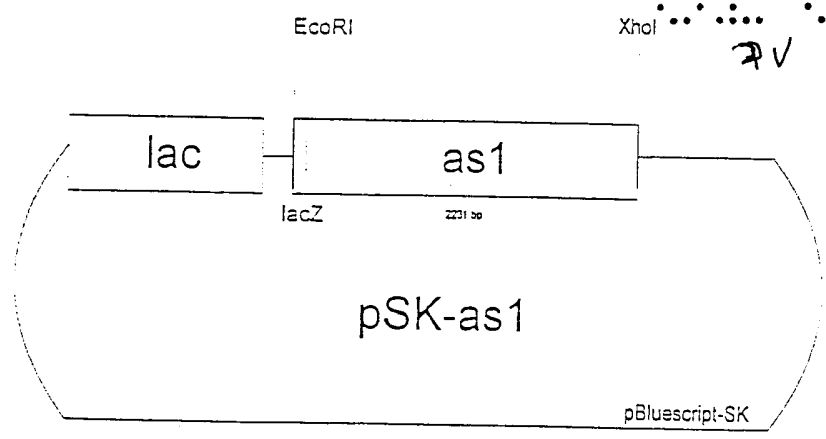
potravinového/krmivového doplňku.

26. Použití fruktosyltransferázy podle nároku 19 pro výrobu polyfruktózy, zejména polyfruktózy inulínového typu.

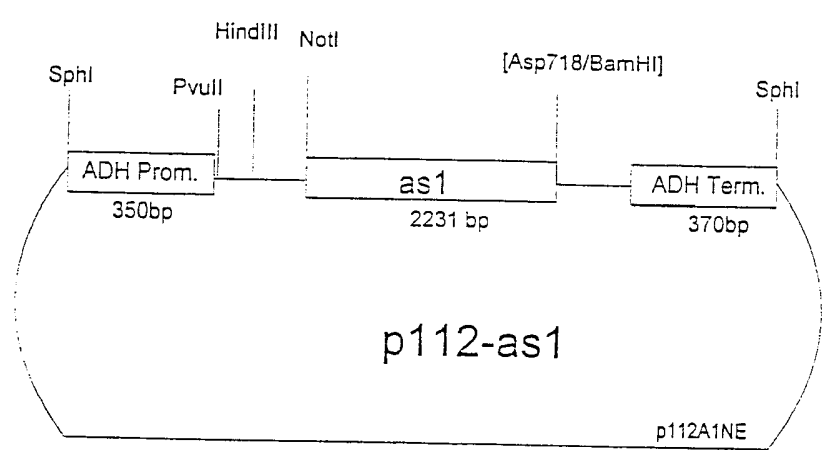
03.05.01

XhoI

2V 2001-294
~~33357~~



Obr. 1



Obr. 2

~~33354~~

The diagram illustrates the p35-as1 plasmid construct. It is a circular plasmid with a pSin19 origin at the bottom. The main construct is a linear sequence of three parts: a CaMV 35S promoter (ca. 540 bp), an as1 coding sequence (ca. 2850 bp), and an OCS-Term terminator (215 bp). Restriction sites are marked above the segments: EcoRI, (SacI), KpnI, SmaI, EcoRI, Sall, and HindIII.

The diagram illustrates the p35-s3-as1 plasmid construct. It is a circular plasmid derived from the pSIN19 vector. The construct contains the following elements in sequence:

- CaMV 35S promoter:** A box labeled "CaMV 35S" with a length of approximately 540 bp.
- S3 gene:** A hatched box labeled "S3" representing the S3 gene.
- as1 coding sequence:** A box labeled "as1 kódující" (as1 coding) with a length of approximately 2850 bp.
- OCS-Term:** A box labeled "OCS-Term" with a length of 215 bp.

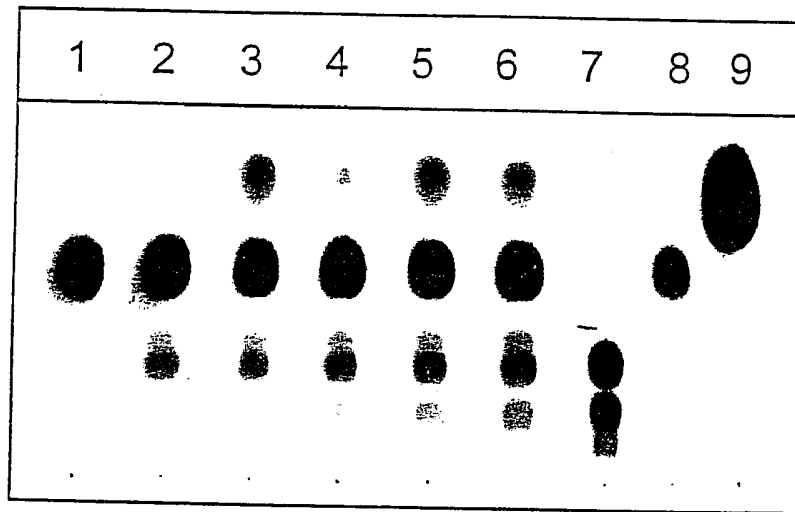
Restriction enzyme sites are marked above the map:

- EcoRI
- (SacI)
- KpnI
- SmaI
- EcoRI
- Sall
- HindIII

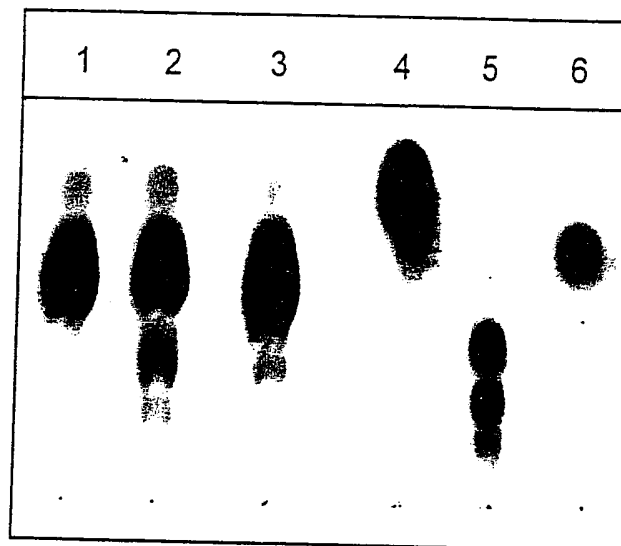
The plasmid name "p35-s3-as1" is written in the center, and the vector name "pSIN19" is at the bottom.

Obr. 5

PV 2001-794
~~33307~~

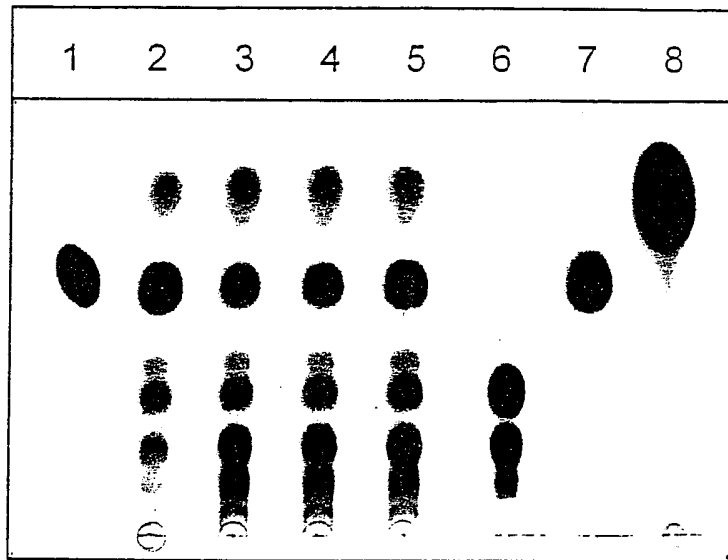


Obr. 6

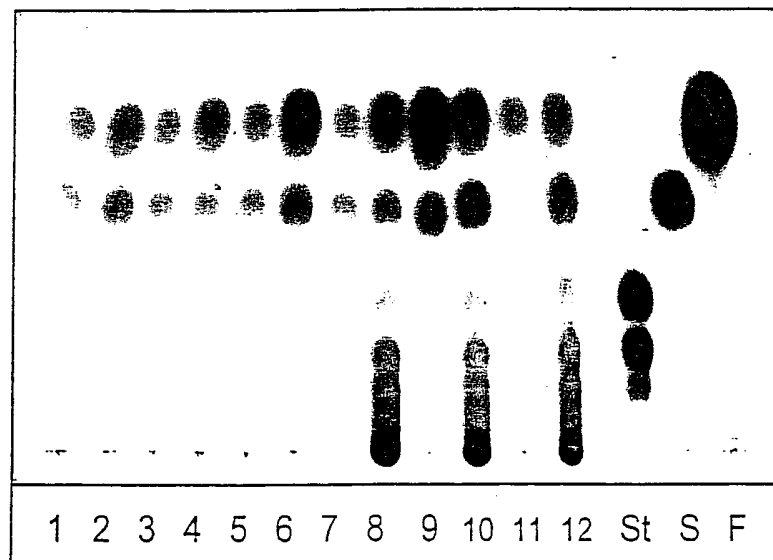


Obr. 7

PV 2001-794
 3335F



Obr. 8

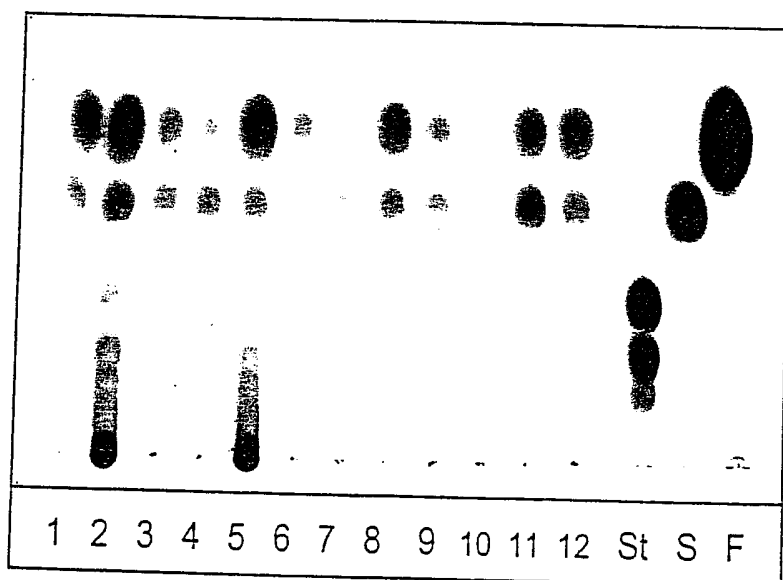


Obr. 9

.....

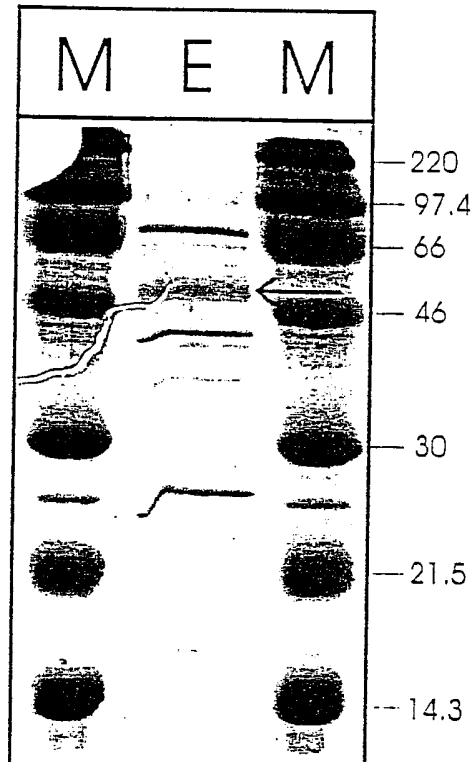
PV 2001-794

33357



Obr. 10

02.05.01
PV 2001-794
333 J8



Obr. 11