(19) OFICIUL DE STAT
PENTRU INVENŢII ŞI MĂRCI
Bucureşti

ROMANIA

(11) Nr. brevet: 112642 B1
(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10; A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54; C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55; C 12 N 15/29;

(12) BREVET DE INVENŢIE

Hotarârea de acordare a brevetului de invenţie poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: **148080**

(22) Data de depozit: **26.01.1990**

(30) Prioritate: **26.01.1989 GB 8901677.8;**

(41) Data publicării cererii:
BOPI nr.

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
28.11.1997 BOPI nr. **11/1997**

(45) Data eliberării şi publicării brevetului:
BOPI nr.

(61) Perfecţionare la brevet:
Nr.

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(86) Cerere internaţională PCT:
Nr. **GB 90 / 00110 26.01.1990**

(87) Publicare internaţională:
Nr. **WO 90/08830 09.08.1990**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
EP-A-0198288, 0240208

(71) Solicitant: **IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC., LONDON SW1P 3JF, GB;**

(73) Titular: **ZENECA LIMITED, LONDRA, GB;**

(72) Inventatori: **BRIDGES IAN GEORGE, SLATER, US; BRIGHT SIMON WILLIAM JONATHAN, MARLOW, BUCKS, GB; GREENLAND ANDREW JAMES, MAIDENHEAD, BERKSHIRE, GB; SCHUCH WOLFGANG WALTER, CROWTHORNE, BERKSHIRE, GB;**

(74) Mandatar: **ROMINVENT S.A. (AGENŢIE PENTRU BREVETE, DESENE, MĂRCI ŞI TRANSFER TEHNOLOGIE) BUCUREŞTI**

(54) CONSTRUCŢIE GENETICĂ CE DETERMINĂ STERILITATE MASCULINĂ LA PLANTE

(57) **Rezumat:** Construcţia genetică, ce determină sterilitate masculină la plante, cuprinde o genă ce codifică o proteină capabilă să disloce biogeneza polenului viabil şi gena de reglare care include o secvenţă promotor, introductibilă prin aplicarea externă a unui inductor chimic la planta care conţine construcţia.

Revendicări: 28
Figuri: 39

RO 112642 B1

Invenția de față se referă la o construcție genetică care determină sterilitate masculină la plante.

Se cunoaște că, în agricultură se utilizează multe plante de cultură pentru obținerea unor alimente destinate consumului uman, pentru producerea unor materii hrănitoare pentru animale, pentru dezvoltarea produselor industriale și pentru alte scopuri. Procedeul cuprinde în mod invariabil plantarea de către fermier a semințelor care au fost achiziționate de la producătorul de semințe. Produsul obținut prin cultură, fie sub formă de plantă întreagă, fie sub formă de semințe sau fructele plantei, este recoltat și apoi este utilizat pentru diferitele aplicații cu scop nutritiv, așa cum s-a menționat mai sus. În afară de achiziționarea semințelor de la o companie de semințe, fermierul se ocupă, de asemenea, cu plantarea din nou a unor semințe salvate din cultura anului precedent. Totuși, acest lucru este folositor din punct de vedere economic pentru culturi, numai, în cazul în care acestea sunt utilizate sub formă de semințe rezultate din încrucișări selective sau din încrucișări depășite. Din punct de vedere economic nu este avantajos pentru culturile sub formă de hibrizi care sunt plantate în vederea obținerii creșterii productivității care se realizează prin heteroză. Majoritatea culturilor plantate în majoritatea regiunilor agricole, sunt plantate sub formă de culturi de hibrizi, care garantează fermierului o creștere considerabilă a randamentului.

Producerea unor semințe hibride de către companii de semințe, specializate, reprezintă un procedeu costisitor și complicat. Procedeul cuprinde reproducerea și selectarea liniilor parentale rezultate din încrucișări selective, care în anumite combinații dau descendenți, aceasta prezentând o maximă adaptare la condițiile zonei înconjurătoare în raport cu realizarea unui randament maxim. Pentru producerea de semințe hibride F1 ca rezultat al unor încrucișări selective, se aleg genitori masculi sau femele. Întrucât majoritatea culturilor sunt hermafrodite, în cazul originii femele într-o încrucișare, aceasta trebuie

masculinizată în vederea obținerii autopolenizării în timpul producerii de semințe. Pentru plantele cu polenizare deschisă, cum este, de exemplu, porumbul, se utilizează un regim de plantare special, în vederea minimalizării autopolenizării în cazul originii femele. Aceasta cuprinde separarea acelor plante care trebuie utilizate ca masculi, din plantele cu origine femelă. Astfel se permite separarea ușoară a semințelor hibride F1, la sfârșitul sezonului.

Masculinizarea poate fi astfel obținută, fie mecanic, așa cum s-a utilizat în cazul porumbului, fie manual așa cum s-a utilizat în cazul tomatelor sau chimic, așa cum s-a utilizat în cazul grâului sau orezului și genetic utilizându-se sterilitatea masculină citoplasmatică (CMS) sau incompatibilitatea genetică așa cum s-a utilizat în cazul semințelor de rapiță cu ulei, în cazul sfeclei de zahăr și altele. Acestea sunt deci modificări asemănătoare în complexitatea lor în practicile agricole sau în cazul manipulării plantelor, dar de obicei acestea sunt costisitoare ca mod de administrare, complexe ca efectuare și relativ ineficiente, dependent de sistemul care este utilizat. Această ineficiență se datorează faptului că este nevoie ca plantele fertile să fie sterilizate pentru producerea de semințe, aceasta apărând pe suprafețe mari, în funcție de cultură. De aceea, manipularea femelelor trebuie să fie efectuată pe scară largă.

Construcția genetică, conform invenției, înlătură dezavantajele menționate mai sus, prin aceea că, cuprinde o genă ce codifică o proteină capabilă să disloce biogeneza polenului viabil și gena de reglare care include o secvență promotor introductibilă prin aplicarea externă a unui inductor chimic.

Conform prezentei descrieri de invenții, se face referire la obținerea unei gene de plantă care să includă gena proteinei dislocate, capabilă de dislocare în biogeneza polenului viabil și la o secvență de control a genei care include o secvență promotoare care este indusă prin aplicarea externă a inductorului chimic exogen la planta care conține construcția genetică

de mai sus.

De preferință, secvența de control include un operator de control al genei proteinei dislocate menționate mai sus și o genă represoare codificată ca proteină represoare adaptată pentru a lega gena operator a proteinei dislocate menționată mai sus, gena proteinei represoare fiind sub controlul promotorului inductibil chimic, menționat.

De preferință, așadar, această construcție genetică include secvența operator specifică pentru florile masculine, operativ legată la gena proteinei dislocate, pentru exprimarea de restricție a genei proteinei dislocate, la părțile masculine ale florii plantei.

Prezenta invenție se referă, așadar, la plantele transformate și la porțiuni de plantă, cum ar fi, de exemplu, celule, protoplaști și semințe încorporând construcția genetică, conform prezentei descrieri de invenție.

Conform unei forme de realizare preferate a prezentei invenții, se face referire la o construcție de DNA recombinant pentru inserția în genomul plantei, pentru a determina o sterilitate masculină recuperabilă a acestuia, care cuprinde:

(a) o primă secvență a genei promotoare responsabilă de prezența sau absența inductorului chimic exogen;

(b) o genă care codifică o proteină represoare sub controlul primei secvențe promotoare menționată mai sus;

(c) o secvență operatoare responsabilă de proteina represoare menționată mai sus;

(d) un al doilea promotor al secvenței genetice care este exprimată numai în cazul părților masculine ale plantei și

(e) o genă codificând un inhibitor de proteină esențial caracteristic al plantei, pentru producerea polenului viabil, astfel prezența sau absența inductorului chimic exogen determinând selecția fertilității masculine sau respectiv a sterilității acestuia.

În conformitate cu prezenta invenție, se face referire, de asemenea, la o plantă care este recuperabilă ca sterilitate masculină, această plantă conținând stabil încorporată în genomul acesteia, construcția de DNA recombinant, așa cum s-a definit mai sus.

Se preferă ca primul promotor menționat să promoveze exprimarea proteinei represoare în ceea ce privește stimularea cu ajutorul inductorului chimic exogen, prin care în absența inductorului chimic,nu este exprimată nici o proteină represoare în interacțiunea cu operatorul, astfel, permițându-se exprimarea genei codificând inhibitorul de fertilitate masculină și în prezența inductorului chimic, proteina represoare este exprimată astfel, ca, să se prevină exprimarea ca genă codificând inhibitorul de fertilitate masculină și readucerea plantei în acest fel, la stadiul de fertilitate. Astfel, construcția genetică conform prezentei descrieri de invenție, conține diferite secvențe operativ unite (a) la care s-au făcut referiri mai înainte, de convenienţă, ca "comutator chimic", (b) "secvență represoare", (c) "operator", (d) "control MFS" (de exemplu, controlul specific al florii masculine) și (e) genă de dislocare. Elementele esențiale pentru fiecare din secvențe și interacțiunea lor, se vor descrie în continuare cu referire la desenele însoțitoare.

Prezenta descriere de inveție permite producerea unor încrucișări selective care transmit sterilitatea masculină utilizându-se diferite tehnici moleculare și propuneri de rezolvare. Aceste plante au nevoie de un sistem de comutare chimic pentru reversarea fertilității (sterilitate masculină reversibilă; RMS). Ambele aspecte ale acestui sistem sunt moștenite ca caractere de tip Mendelian. Aceasta se poate obține prin inserția în genomul plantei a elementelor moleculare necesare pentru funcția de control a RMS.

Invenția poate fi, de asemenea, utilizată pentru plante monocotiledonate sau pentru plante dicotiledonate, de la care crescătorii sau cultivatorii așteaptă să producă semințe hibride F1 și pentru care tehnicile convenabile de transformare sunt sau devin corespunzătoare, în special, în cazul porumbului, grâului, florii soarelui, semințelor de ulei de rapiță, tomatelor sau

altor vegetale, pentru sfecla de zahăr și pentru plante cu foliaj ornamental sau cu flori ornamentale. Este un mare avantaj în reducerea costurilor de dirijare în culturi asociate cu producerea semințelor hibride F1, comoditate în controlul purității semințelor hibride, menținerea liniilor RMS și a populațiilor, transferul RMS între linii și populații etc.

În cadrul unei aplicații specifice se va descrie producerea plantelor, în special, a plantelor rezultate din încrucișări selective, care transmit sterilitatea masculină utilizându-se tehnici de inginerie moleculară. Aceste plante pot fi readuse în stare de fertilitate utilizându-se un spray chimic care duce la restaurarea fertilității, utilizându-se cascada de control molecular. Metoda arătată în prezenta descriere de invenție, constă dintr-un număr de componente individuale care sunt subiectul unor invenții separate care descriu aplicații mai largi ale componentelor.

1. Procedeul general

Fig. 1, dintre desene, reprezintă o diagramă a construcției de DNA, conform prezentei invenții, în stadiu de "sterilitate masculină". În absența inductorului chimic exogen, comutatorul chimic este inactiv și nici o proteină represoare nu este exprimată prin secvența represoare. În absența proteinei represoare, secvența operatoare permite exprimarea proteinei dislocate în țesutul specific masculin, exprimarea fiind specific direcționată spre părțile masculine prin prezența secvenței de control MFS. Efectul este acela că planta este sterilă pentru părțile masculine și incapabilă de a produce polen viabil și astfel este incapabilă de autopolenizare. Utilizarea practică a acestui efect este aceea că, dacă astfel de plante reprezentând partea femelă în intenție de încrucișare, sunt plantate în apropiere de părțile masculine de origine în intenție de încrucișare, acestea vor fi polenizate de către polenul de la partea masculină pereche.

Fig. 2, arată operația de obținere a construcției în stadiul de "mascul fertil". Când inductorul chimic este adus în contact cu planta, comutatorului chimic este activat, producând proteina represoare care trebuie exprimată. Proteina represoare leagă apoi operatorul, prin expresia de inhibare a proteinei dislocate și prin restaurarea fertilității masculine. Utilizarea practică a acestui mod de operare a construcției este aceea că, ea permite producerea polenului viabil și autopolenizarea plantei care conține această construcție în vederea faptului că linia poate fi perpetuată pentru o utilizare viitoare.

2. Sistemul de comutare chimică

Un mare număr de promotori de plante sunt considerați a fi induși utilizându-se semnale chimice. Totuși, s-a demonstrat numai prin câteva exemple că. comutatorii chimici specifici în exprimarea genei în țesuturi au nevoie de acest model. Gena de un interes special este gena codificând subunitatea glutation-S-transferazei II (GSTII) de 27 kd. Această genă este indusă în mod specific după tratamentul țesuturilor plantei, în special. după dezvoltarea anterelor utilizându-se agenți de siguranță chimici. Un astfel de agent de siguranță este compusul N,N-dialil-2,2-dicloracetamida, dar acesta se referă la compușii care au caracteristici de mobilitate îmbunătățite în țesuturile plantelor, combinate cu persistența îmbunătățită pentru această aplicație, eficacitate și siguranță. Acești compuși au fost descriși, de asemenea, în literatura de specialitate.

De asemenea, este evident că, promotorii induși chimic pot fi utilizați în acest procedeu. Unii dintre aceștia pot fi de origine din plante, alții pot fi de origine fungică sau din drojdii. Se subînțelege în prezenta invenție că, acei promotori și combinații chimice convenabile pentru procedeul RMS, pot fi utilizați în cazul GSTII și ca agenți de siguranță.

3. Secvențele represoare și operatoare

În cadrul primei forme de realizare a prezentei descrieri de invenție, s-a propus utilizarea interacțiunii bine caracterizate între operatorii bacterieni cu represorii acestora, în controlul exprimării funcției genei "de distrugere".

Represorii bacterieni, în special, represorii lac sau represorii utilizați prin 434, P22 și bacteriofagi lambda, pot fi utilizați pentru controlul exprimării în celulele plantei, ca fiind efectivă.

În cadrul celei de a doua forme de realizare a prezentei descrieri de invenție, este posibilă utilizarea "pseudo-operatorilor", a operatorilor care sunt similari dar nu identici pentru o utilizare normală a operatorilor într-o combinație specială operator-represor. S-a demonstrat că, utilizându-se o selecție corespunzătoare, a sistemului de represori mutanți poate fi generat ca fiind recunoscuți pseudo-operatorii din genele plantei. Se descrie în continuare selectarea represorilor mutanți de recunoaștere a pseudo-operatorilor care sunt găsiți în genele plantei.

Un alt mod de reglare inferioară a genelor "agenților de distrugere" care poate fi considerat, este utilizarea RNA antisens. Aceasta s-a demonstrat ca un lucru bun pentru reglarea poligalacturonazei exprimată în timpul maturizării fructelor de tomate și este descris în literatura de specialitate.

4. Caseta exprimării specifice a florilor masculine

Așa cum deja s-a menționat, exprimarea genelor "agenților de distrugere" trebuie să aibă loc în țesuturile specifice ale florilor masculine (MSF).

Acestea pot fi țesuturi găsite în anterele în curs de dezvoltare, în țesuturi asociate cu dezvoltarea anterelor și polen.

Secvențele de DNA promotor care direcționează expresia genelor în țesuturile MFS pot fi obținute folosind modurile de lucru pentru identificarea genelor exprimate în țesuturile MFS prin selecția diferențială a colecțiilor de cDNA clonate în diferitele sisteme vector, izolarea genelor codificând aceste colecții de cDNA din colecțiile genomice utilizând ca vectori bacteriofagi lambda și caracterizarea secvențelor promotorilor lor utilizând secvențializarea DNA și a experimentelor analitice de transformare a plantei.

5. Gena de dislocare

Inhibarea formării polenului va fi obținută prin utilizarea noilor gene "ca agenți de distrugere" care, atunci când se exprimă specific în florile masculine în timpul formării polenului (pentru detalii vezi mențiunile de mai sus), va determina moartea celulelor din antere, precum și țesuturi asociate, celule de polen-mamă, polen și țesuturi asociate. Aceasta va duce la un insucces al formării de polen și la plante care au porțiunile masculine sterile. Originea genelor "agenților de distrugere" poate fi sub forma unei varietăți de surse naturale, ca, de exemplu, celule umane, celula de drojdie, celule de plante, celule de fungi sau acestea pot fi total sintetice care pot fi compuse din secvențe de DNA dintre care unele pot fi găsite în natură sau un amestec din acestea. Genele "agenților de distrugere" au de preferință, un efect asupra metabolismului mitocondrial, așa cum a fost foarte clar demonstrat că un supliment substanțial de energie este absolut necesar pentru producerea polenului fertil. Totuși, este așadar arătat că, funcția de "agent de distrugere" poate fi efectiv orientată către alte funcții biochimice esențiale, cum ar fi, de exemplu, metabolismul DNA, sinteza de proteine și alte căi metabolice. Două din aceste construcții de DNA constau din acele secvențe codificate de proteine necuplate de țesuturi adipoase de la mamifere brune sau variante ale acestora sau gena sintetică care constă dintr-un domeniu orientat către mitocondrii și domeniul lipofilic care permite inserarea proteinelor în membrana mitocondrială.

6. Producerea unui modul de exprimare care constă din secvențele de promotori MFS și genele "agenților de distrugere"

Producerea unui modul de exprimare care constă din secvențele de control a genei specifice florii masculine (control MFS) și genele "agenților de distrugere" va fi realizată utilizându-se tehnicile moleculare stabilite. Exprimarea acestui modul în încrucișările selective de elită vor conduce la producerea plantelor masculine sterile.

7. Transformarea

Plantele transgenice sunt obținute prin inserția construcțiilor descrise în genomul plantelor. Procedeul de transformare specifică utilizat pentru inserția construcțiilor de gene, conform prezentei descrieri de invenție, în genomul plantei nu este cu adevărat de aceeași origine în prezenta invenție. Din literatura de specialitate, se cunosc numeroase procedee, cum ar fi, de exemplu, agroinfectoarea, prin utilizarea de *Agrobacterium tumefaciens* sau a plasmidei acestuia Ti,electroporația, microinjectarea celulelor de plantă și a protoplaștilor, transformarea microproietilelor și transformarea tubului de polen, menținând doar câteva. În literatura de specialitate se fac referiri detaliate la metodele cunoscute.

8. Reversia sterilității

Se pare că plantele care sunt devenite sterile utilizându-se tehnicile de mai sus și metodele menționate, nu sunt dorite, *per se*. Deoarece se propune să se utilizeze o cascadă de elemente moleculare care vor permite reversia sterilității manevrate la fertilitate, permițându-se astfel menținerea acestor plante și utilizarea lor în producererea de semințe hibrize F1.

Designul mecanismului de reversie: mecanismul de reversie propus în prezenta descriere de invenție constă din trei elemente separate: a) un promotor comutabil chimic; b) o secvență operatoare bacteriană; c) o genă represoare bacteriană care se leagă cu mare afinitate la operatorul menționat mai sus.

Aceste elemente vor acționa în următorul mod: când restaurarea fertilității este necesară (de exemplu, în vase în care se menține încrucișarea selectivă), plantele sunt pulverizate cu substanța chimică. Această substanță chimică este indusă prin promotorul inductibil chimic de exprimare a moleculei represoare bacteriene care se va lega la secvențele operatoare de DNA în secvențele de control MFS. Această legare va duce la inhibarea funcționării genei "agentului de distrugere" astfel permițându-se formarea normală de polen.

9A. Aplicație la producția de hibrizi F1

Fig. 1 reprezintă schimbările moleculare care au loc atunci când RMS este utilizat în plante de elită. Trei procedee genetice sunt convenabile pentru exprimarea trăsăturilor introduse, în funcție de felul în care acestea sunt destinate să acționeze: ca dominante sau ca gene recesive și dacă exprimarea este aranjată astfel ca să se producă în țesutul sporofitului sau gametofitului de origine. Aceste procedee sunt arătate în tabelul I de mai jos.

Tabelul I

Producerea de hibrizi F1

Forma de exprimare genetică	Genotipul RMS			Sarcina de polen fertil F1
	Încrucișare selectivă femele (MS)	Încrucișare selectivă masculi	Hibrid F1	
Dominant sporofitic	RMS +	+/+	RMS/+ sau +/+	50% plante (+/+) sunt 100% fertile
Recesiv sporofilic	rms/rms	+/+	rms/+	100% plante, sunt fertile 100%
Gametofitic	RMS sau RMS	+ sau +	RMS + sau +	50% plante sunt fertile 50%

De exemplu, atunci când componentele RMS, în special, funcțiile "genei distrugătoare" sunt exprimate ca gene dominante este recomandabil să se utilizeze RMS în stadiul de heterozigoți (RMS/+ în clasificarea "sporofitic dominantă" menționată mai sus). Se subînțelege în acest caz că în timpul producerii de semințe hibride F1, hibrizii care rezultă sunt fie, RMS/+, fie +/+ în genotipul lor. Aceasta înseamnă că numai 50% din plantele (+/+) vor fi capabile să contribuie la producerea de polen în F1 utilizat pentru producerea de semințe. Aceasta va fi suficient pentru majoritatea culturilor, în special în cazul porumbului, în care este produsă o mare cantitate de polen.

Important este că RMS poate fi așa dar utilizat pentru producerea altor clase de hibrizi cum ar fi, de exemplu, încrucișări pe calea trei sau patru. În cadrul formei de realizare din prezenta invenție menționată mai înainte, cu utilizare a exprimării saprofitice dominante, utilizarea genotipului femel RMS/RMS la prima încrucișare, generează în mod comvenabil genotipul RMS/+ în încrucișare cu un polenizator +/+. Genotipul rms/+ constituie apoi originea femelă în cazul sterilității masculine pentru utilizare în cea de a doua încrucișare (vezi tabelul II de mai jos).

Tabelul II

Producerea încrucișării pe calea 3 și calea 4

Forma de exprimare genetică	Genotip RMS				
	Prima fenelă	Primul Mascul	A doua femelă	Al doilea mascul **	Hibridizare pe calea 3 sau 4
Dominant sporofitic	RMS/RMS	+/+	→ RMS/+	+/+	RMS/+ sau +/+
Recesiv sporofitic	rms/rms	ms/rms*	→rms/rms	+/+	rms/+
Gametofitic	RMS sau RMS	RMS sau RMS*	→RMS sau RMS	+ sau +	RMS sau +

În acest tabel, * și ** reprezintă următoarele:

* În aceste forme de realizare primul polenizor este tratat cu comutatorul chimic pentru a restaura fertilitatea masculină.

** Al doilea polenizor poate fi selectiv (calea a treia) sau un hidrid (calea a patra).

9 B. Aplicații în programele de reproducere

În plus față de utilizarea sa largă în producerea de semințe hibride, RMS este așadar convenabil utilizată în programele de reproducere, ca de exemplu în forțarea supraîncrucișării la populațiile sintetice din care derivă noi linii de încrucișări selective. Procedee similare, dar nelimitate la cele prezentate în tabelul de mai sus pentru primul ciclu de producere a căii trei sau patru de încrucișare pot fi utilizate. Utilizarea comutatorilor chimici facilitează următoarea întoarcere la același ciclu pentru a produce genotipuri noi și îmbunătățite. Selecția moleculară (analiza RFLP) utilizând secvențele de DNA derivat din secvențele utilizate pentru facilitarea invenției RMS, poate fi în mod convențional utilizată ca probă în timpul încrucișărilor selective, pentru a asigura că descendența care trebuie să avanseze, a reținut toate elementele sistemului RMS. Aceste strategii oferă un procedeu eficient și comvenabil pentru transferul caracteristicii RMS la noi plasme de aceeași origine.

Prezenta descriere de invenție va fi prezentată prin descrieri specifice ale diferitelor componente de module genetice care pot fi utilizate.

Se dau, în continuare, exemple de realizare a invenției, în legătură și cu fig. 1...39, care reprezintă:

- fig. 1, reprezintă o diagramă bloc a construcției genetice, conform prezentei invenții, cu plante în stadiu masculin steril;
- fig. 2, reprezintă o diagramă bloc a construcției genetice, conform prezentei invenții, cu plante în stadiu masculin fertil;
- fig. 3, prezintă rezultatele activității totale GST în rădăcini și lăstari obținută timp de 23 și 44 h după tratamentul cu R25 așa cum se va descrie în continuare;
- fig. 4, prezintă separarea cromatografică a izomerilor GST I și GST II;
- fig. 5, prezintă activitatea GST I în țesuturile de antere netratate;
- fig. 6, prezintă stimularea activității GST II după tratamentul cu R25 așa cum se va descrie în continuare;
- fig. 7, prezintă rezultatele utilizate în tehnica de rezervor al tulpinei;
- fig. 8, prezintă rezultatele în cazul aplicării spray-urilor;
- fig. 9, prezintă timpul cursului grafic generat în maniera dscrisă mai jos;
- fig. 10, prezintă structura vectorului p35SlacI;
- fig. 11, prezintă structura bazică a pCG2;
- fig. 12, prezintă secvența de nucleotide a promotorului CAB la porumb;
- fig. 13, reprezintă o hartă a seriilor de plasmide pAD și pPS1;
- fig. 14, prezintă procedeul de selecție a colecției utilizate pentru izolarea clonelor specifice florilor de porumb;
- fig. 15. prezintă analiza petei dată de totalul RNA (4 μg per analiză) extras din inflorescențele de porumb cu lungime crescută.
- fig. 16, A, B și C, reprezintă - *in situ* - hibridizarea secțiunilor spice de porumb cu probe de RNA antisens pMS14;
- fig. 17, prezintă secvența de nucleotide și de amino-acizi corespunzătoare a clonei MFS cDNA pMS10;
- fig. 18, reprezintă secvența de nucleotide și de aminoacizi corespunzătoare cDNA MFS pMS14;
- fig.19, prezintă secvența de nucleotide și de aminoacizi corespunzătoare a clonei cDNA MFS pMS18;
- fig. 20, reprezintă un desen al fragmentului de restricție EcoRI de 9kb din clona 10/CT 8-3;
- fig. 21, reprezintă un desen al fragmentului de restricție EcoRI de 9kb din coloana 14/17 M;
- fig. 22, reprezintă o hartă a fragmentului de restricție EcoRI de 9kb din coloana 18/CT3;
- fig. 23, reprezintă o hartă a plasmidei a clonei pMS10-5;
- fig. 24, reprezintă o structură a pTAK1, pTAK2 și pTAK3 și
- fig. 25, reprezintă o hartă a clonei pMS10-6GUS;
- fig. 26, reprezintă o hartă a plasmidei pCGS110-UGP;
- fig. 27, reprezintă o secvență mRNA a genei proteinei de mamifere, necuplate, din plasmida pCGS110-UCP (așa cum se arată în fig. 24);
- fig. 28, reprezintă o schiță a generației unei tulpini de drojdie leu2, gal1;
- fig. 29, reprezintă un tablou care demonstrează efectul adiției de galactoză asupra dezvoltării BET9 și BET27 ca transformanți;
- fig. 30, prezintă rezultatele analizei curbei de dezvoltare a transformanților BET9 (fig. 28A) și BET 27 (fig. 28B), pe mediul de dezvoltare compus din gly/cas o perioadă de timp de peste 65 h în prezența sau absența galactozei;
- fig. 31, prezintă analiza curbei de dezvoltare a UCP de șobolan în tulpina BET9 dezvoltată pe mediu de gly/cas o perioadă de peste 50 h în prezența sau absența galactozei;
- fig. 32, prezintă analiza curbei de dezvoltare a UCP din șobolan în tulpina BET9 dezvoltată pe mediu de rafinoză o perioadă de timp de peste 45 h în prezența sau absența galactozei;
- fig. 33, ilustrează construcția plasmidei YIP/UCP din pKV49-UCP și Ylp5;
- fig. 34, reprezintă o hartă a plasmidei pGR208 (fig. 32 A) și secvența

oligonucleotidelor utilizate ca mutant pentru gena subunității -β a F1-ATP-azei (fig. 32B);

- fig. 35, reprezintă hărți ale plasmidelor pKV49 (fig. 33A) și pKV49-UCP (fig. 33B);

- fig. 36, prezintă schematic construcția proteinei de fuziune subunitate -β/β-galactozidază;

- fig. 37, reprezintă o hartă a plasmidei Pkv49/BLZ;

- fig. 38, reprezintă o hartă a plasmei pMS10-5 și

- fig. 39, reprezintă o hartă a plasmidei pBin/MS10-ICP.

Plasmidele

Diferite construcții genetice sunt descrise în următoarele paragrafe și acestea au fost depozitate la Colecția Națională de Bacterii Industriale și Marine de la Aberdeen, UK. Datele de Depozitare și Numerele de acces sunt arătate în tabelul III, de mai jos.

Tabelul III

Plasmida	Gazda	Data depozitării	Numărul de acces
pGAL2	*Escherichia coli* DH5α	6 decembrie 1988	NCIB 40087
p35SlacI	*Escherichia coli* TG-2	12 decembrie 1988	NCIB 40092
pPS1	*Escherichia coli* DH5α	21 decembrie 1988	NCIB 40097
pAD18	*Escherichia coli* DH5α	21 decembrie 1989	NCIB 40098
pMS14	*Escherichia coli* DH5α	9 ianuarie 1989	NCIB 40099
pMS18	*Escherichia coli* RR1	9 ianuarie 1989	NCIB 40100

Exemplul 1. *I. Comutatorul chimic: Acest modul este exemplificat printr-o secvență promotoare a genei inductibilă chimic izolată dintr-o subunitate a genei glutation-S-transferazei din porumb (GST II) de 27 kd.*

În practica promotorului inductibil chimic al prezentei invenții, se va insera ca o secvență promotoare într-o construcție a genei recombinante destinate utilizării la plante. Construcția va fi apoi inserată în plantă prin transformare. Exprimarea proteinei genelor codificate în construcție, fiind sub controlul promotorului comutator chimic, conform prezentei descrieri de invenție, poate fi controlat prin aplicarea inductorului chimic la plante.

Ca exemple de combinații de promotori chimici și inductori, se dau promotorii efectivi ca, de exemplu, promotorul GST II menționat mai sus și inductorul care este compusul N,N-dial-2,2,-dicloracetamidă (denumirea comună dicloramida) sau benzil-2-clor-4-(trifluormetil)-5-tiazol-carboxilatul (denumire comună: flurazol).

Ca exemple de inductori chimici care sunt inductori potențiali ai expresiei subunității GSTII 27 de kd, includ compuși ca: 1) benzil-2-clor-4-(trifluormetil)-5-tiazolcarboxilat; 2) naftalen-1,8-di-carboxilic anhidrida; 3) 2-diclormetil-2-metil-1,3-dioxolanul; 4) 1-(dicloracetil)-hexahidro-3,3,8a-trimetilpirol(1,2-a)-pirimidin-6(2H)-ona; 5) 2,2,5-trimetil-N-dicloracetiloxazolidina; 6) 1,3-dioxolan-2-ilmetoximono(fenil)benzenul acetonitril; 7) 4,6-diclor-2-fenil-pirimidina; 8) 2,2-diclor-(N-alil-N(1,3-dioxalano-2-metilacetamida; 9) 1-(cianomeroxiimino)benzacetonitril; 10) 4'-clor-2,2,2-trifluor-acetofenona-o-1,3-dioxolan 2-il metiloxima; 11) 2,2-diclor-1,(3,4) dihidro-3-metil-2H-metil-2H-1,4-benzoxazin-4-il)etanona; 12) 3-di-cloracetil-2,2-dimetiloxazolidina; 13) 4-metoxi-3,3-dimetilbenzofenona; 14) ciclohexil-4,4-dimetil-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)pent-1-en-3-ol); 15) 2,2-diclor-N-(3-metil-4-tiazolin-2-iliden)acetamida; 16) O,O-dietil-O-fenil fosforotioat; 17) 2,2-spirociclohexil-N-diclor-acetil oxazolidină; 18) N-benzil-N-etil-diclor-acetamidă; 19) 3-cloracetil-4,4-ciclohexan-

spiro-2,2-dimetil-1,3-oxazolidină și 20) spiroxazolidina acetamida.

Glutation-S-transferazele (GST) sunt o familie de enzime care catalizează conjuncția glutationei prin gruparea sulfhifril spre o serie largă de compuși hidrofobici, electrofilici. Rezultatele conjugării se concretizează prin detoxificarea acestor compuși și în insecte și mamifere, prin îndepărtarea din țesuturi.

Enzimele GST au fost identificate într-o serie largă de culturi de plante, incluzând porumbul, grâul, sorgul și mazărea. GST cuprinde de la 1 la 2% din totalul proteinelor solubile în răsadurile de porumb etiolate.

Izoforma majoritară a GST poate fi distinsă în țesutul porumbului. GST I este constitutiv exprimată și este capabilă de conjugarea glutationei cu ierbicidele pre-emergente alachlor și atrazina. Tratamentul țesuturilor de porumb cu agenți chimici de siguranță (de exemplu N,N-dialil-2,2-dicloracetamida) duce la creșterea activității GST I care participă la detoxificarea ierbicidelor pre-emergente.

Tratamentul cu agenți de siguranță al țesuturilor de porumb

Pentru tratamentul răsadurilor tinere de porumb, semințele sunt germinate pe hârtie de filtru umedă. După germinare și dezvoltare (peste o săptămână) se adaugă agentul de siguranță N,N-dialil-2,2-dicloracetamida (în prezenta descriere de invenție se referă la R25), la apa din hârtie de filtru pentru a se obține concentrații de ordinul a 0,003 până la 30 ppm și răsadurile sunt dezvoltate timp de încă 23 până la 44 h înainte de recoltarea țesuturilor din rădăcini și tulpini. Fig. 3 arată rezultatele obținute pentru activitatea totală a GST în rădăcini și tulpini obținută după 23 și 44 h după tratament, așa cum s-a descris și fig. 4 reprezintă separarea izozimelor GST I și GST II.

Pentru tratamentul inflorescenței de porumb și a țesuturilor amterei, o soluție formată din 800 µg de R25 se injectează în mod direct sub locul de dezvoltare al inflorescenței de porumb. Operația continuă apoi încă 48 până la 72 h. Fig. 5 reprezintă faptul că numai activitatea GST I este prezentă în țesutul de anteră netratat și fig. 6 arată stimularea activității GST II după tratament, așa cum s-a descris mai înainte.

În mod alternativ, o soluție de 100 ppm de R25 a fost adusă într-un rezervor de sticlă atașat la tulpina expusă, imediat sub locul de dezvoltare a inflorescenței de porumb. Fig. 7 arată rezultatele obținute prin utilizarea tehnicii rezervorului tulpinei.

În mod adițional, R25 se aplică în cantitate de 100 ppm prin apreciere directă pe inflorescența de porumb dezvoltată și expusă. Fig. 8 arată rezultatele obținute prin aplicarea spray-ului.

Ambele proteine GST au o greutate moleculară nativă de aproximativ 50 kd. Așa cum este în cazul mamiferelor, porumbul este GST dimeric; GST I are subunități aparent identice de 29 kd, în care GST II este un heterodimer al subunității similare de 29 kd cu cea găsită în GST I și noua subunitate de 27 kd care este prezentă numai în țesutul tratat cu agentul de siguranță, exceptând rădăcinile răsadurilor în care acesta este constructiv exprimat, dar încă poate fi indus prin tratamentul cu agenții de siguranță.

cDNA și gena corespunzătoare subunității GST I de 29 kd au fost clonate în prealabil și secvențializate. În plus, cDNA corespunzătoare la subunitatea de 26 kd a celei de a treia componente minore a activității GST în răsadurile de porumb (GST III) a fost în prealabil clonată și secvențializată.

Analiza enzimelor

Activitatea enzimelor a fost măsurată spectrofotometric la 340 nm, utilizându-se ca substrat, 1-clor-2,4-dinitrobenzenul (CDNB). Amestecul tampon de reacție conține 0,1 M EDTA, 0,001M CDNB și 0,0025M glutationa.

Prepararea extractelor și purificarea enzimelor

Țesutul este omogenizat în 0,05 M Tris.HCl, la *p*H 7,8; 0,001M EDTA; 0,001M DTT și 7,5% polivinilpirolidonă într-un mojar, cu mortar, la temperatura de 4°C, se centrifughează la 30000 g pentru a se obține un extract brut.

Separarea izoformelor GST din extractul brut este obținută după cum urmează: extractul brut este aplicat la o

coloană de DEAE Sepharoză și se spală cu 0,01 M.Tris, HCl, la *p*H 7,8; 0,001 M EDTA; și 0,001M DTT.GST legat este eluat cu clorură de potasiu 0,3 M. Fracțiunile conținând activitatea GST sunt combinate și desalinizate, utilizându-se gel filtrarea pe coloană PD10. Separarea izoformelor GST I și GST II este obținută prin cromatografie FPLC pe o coloană mono-Q și zero până la 0,4 M clorură de potasiu gradient de concentrație.

Mostrele pure de GST I și GST II sunt obținute prin aplicarea fracțiunilor de desalinizare GST I și GST II din cromatografia FPLC pe o coloană cu afinitate pentru glutation-S-sepharoză, echilibrată cu un tampon fosfat 0,05 M la *p*H 7,3. După spălare cu un amestec tampon, GST legat este eluat cu 0,005 M glutationă.

SDS-PAGE (17,5%, 30:0,174 acrilamidă: bisacrilamidă) pentru GST I sau GST II, se obține prin concentrarea mostrelor pure de GST, utilizându-se Amicon Centricon 10 Microconcentrații, mostre denaturate în mercaptoetanol conținând amestecul tampon Laemmli prin colorarea gelurilor cu Albastru Coomassie.

Generarea anticorpilor la enzime

Proteine suficiente pentru a se efectua imunizarea la iepuri, au fost obținute prin acumularea enzimelor izolate în subunități izolate, așa cum s-a descris mai înainte, dintr-un număr de experimente separate. Polipeptidele GST II de 27 kd sunt apoi purificate într-o evidentă omogenitate, prin electroeluare din porțiunile de gel poliacrilamidice. Antiserurile sunt preparate în raport cu polipeptidele de 27 kd. Imunizarea iepurilor este efectuată în esență, conform Mayer și Walker, 1978.

Analiza secvențelor N-terminale

Secvența terminală aminică a subunității intacte a GST II de 27 kd sau produsele de clivaj parțial proteolitic, se determină prin degradarea secvențială Edman și apoi prin analiza cromatografică HPLC ulterioară a aminoacizilor.

Cursa de timp

Experimentul cursei de timp a fost efectuat pentru examinarea exprimării GST după tratamentul cu agentul de siguranță. O soluție având 30 ppm de R25 se aplică la rădăcini de răsaduri în vârstă de trei zile și țesutul recoltat după diferite intervale de timp urmează tratamentul cu agenții de siguranță. Mostrele sunt testate apoi pentru activitatea GST, utilizându-se analiza enzimatică descrisă mai sus. Rezultatele acestui experiment sunt prezentate grafic în figura 9.

Sinteza colecțiilor cDNA

Experimentele privind cursa de timp arată un maxim al exprimării GST la 48 h după tratamentul cu agentul de siguranță. De aceea, două colecții de cDNA sunt construite din RNA extras din țesut la 24 și 48 h după tratamentul cu agentul de siguranță. Pentru a se asigura că procedeul de inducție a fost realizat cu succes, o probă de un gram este luată pentru inducția în țesut timp de 24 h și se analizează pentru GST II. Experimentul arată că țesutul utilizat pentru construcția colecției cDNA a fost întradevăr indus cu succes, ca GST II numărat pentru 45,5% din totalul activității GST.

cDNA dublu catenar este preparat din oligo-dT-celuloză purificată RNA prin metoda utilizând RNA și DNA polimeraza I a *Escherichiei coli* în sinteza catenei a doua, fără o prealabilă purificare a cDNA cu o catenă, așa cum este menționat în Gubler și Hoffman, 1983.

Selecția colecțiilor de cDNA cu antiseruri GST I și GST II

În vederea identificării clonei cDNA codificată cu enzima GST din inflorescența de porumb, bacteriofagul din colecția cDNA amplificată este selectat cu enzima antiser GST din porumb. Clonele care produc semnalele cele mai puternice sunt reselectate.

Selecția colecțiilor cDNA utilizându-se oligo probe

Amestecurile de oligonucleotide sinterice bazate pe secvența de amino-acizi determinată mai sus, sunt preparate prin sinteza chimică de fosforoamidită. Capetele 5' ale oligonucleotidelor sunt marcate utilizându-se polinucleotid-kinaza, așa cum s-a descris în literatura de specialitate.

Aproximativ 40000 fagi conținând cDNA sunt amplificați pe discuri și transferați pe nitroceluloză. Filtrele sunt hibridizate pe probele de oligonucleotide la temperaturi cuprinse între 2 și 5°C, sub

temperatura de topire calculată pentru proba din amestec cu cel mai scăzut punct de topire. Plăcile de hibridizare sunt selectate prin două sau mai multe cicluri,așa cum s-a descris mai sus, la densități mai mici.

Izolarea secvențelor de gene cDNA prin metoda PCR

Secvențele cDNA sau DNA sunt izolate din colecțiile descrise, utilizându-se oligoprimeri bazați pe secvența de aminoacizi obținută printr-un clivaj parțial proteolitic sau în cazul DNA genomic, primerii bazați pe secvența cDNA sunt determinați așa cum s-a menționat mai sus.

Caracterizarea și analiza secvenței clonelor GST cDNA

cDNA izolat este caracterizat și supus la secvențializare printr-una sau mai multe tehnici standard convenabile.

Izolarea secvențelor genomice. O colecție genomică existentă a fragmentelor de DNA din porumb total clonate în λ EMBL 3 se utilizează pentru izolarea clonelor care hibridizează clonele cDNA izolate așa cum s-a descris mai sus.

În mod alternativ, metoda PCR descrisă mai înainte poate fi utilizată pentru o amplificare selectivă și clonarea fragmentelor genetice. Genele GSTII și secvențele promotoare pot fi apoi izolate și caracterizate utilizându-se tehnicile stabilite. Se poate demonstra că secvențele promotoare GSTII mediază activitatea genei indusă de agenții de siguranță prin fuziunea lor la genele marker cum ar fi GUS și CAT și prin testarea lor în plantele transgenice.

Exemplul 2. *II. Secvențele represoare și operatoare*

Acest modul reglează exprimarea genetică a plantei. Mult mai special, modulul reglează exprimarea genetică a plantei prin utilizarea moleculelor represoare bacteriene sau a originii eucariotice inferioare.

În mod tradițional, îmbunătățirea speciilor plantelor de cultură cuprinde introducerea caracteristicilor dorite prin încrucișări genetice. Cu toate acestea, aceste tehnici de reproducere au un succes mare, prin aceea că nu sunt prevăzute nici un fel de mijloace de control pentru exprimarea noilor caracteristici dobândite. Noile cuceriri tehnologice permit în prezent responsabilitatea genetică pentru determinarea structurii plantei și productivitatea și calitatea culturii care trebuie să fie identificată și izolată. Un scop major în domeniul îmbunătățirii culturilor de plante este capacitatea de a manipula procedee genetice de dezvoltare genetică în vederea îmbunătățirii performanței culturilor. Esențial în acest caz este determinarea strategiilor care permit exprimarea genelor specifice ale plantelor care urmează a fi reglate.

Abilitatea de control a exprimării caracteristicilor, conform circumstanțelor, are multe aplicații importante, cum ar fi, de exemplu, controlul genelor rezistente la insecte, determinarea înălțimii plantelor și sincronizarea înfloririi, precum, și controlul fertilității plantelor. Adițional, abilitatea de comutare genetică în sensul dorit, fără a se produce tulburări în fiziologia plantei sau în zona înconjurătoare, ceea ce ar fi un instrument de neprețuit în studierea geneticii plantelor perse.

În mod curent, producerea de semințe pentru culturi hibridizate ca, de exemplu, culturile de porumb, include procedee laborioase și costisitoare de masculinizare manuală sau mecanică a plantelor de origine în vederea prevenirii autopolenizării. O astfel de masculinizare poate totuși să fie controlată genetic prin utilizarea unei caracteristici cunoscute ca, de exemplu, sterilitatea masculină citoplasmatică (CMS) care a fost observată la o gamă de specii de plante de cultură. Sterilitatea masculină citoplasmatică (CMS) interferează cu gametogeneza masculină, rezultând în inhibarea formării de polen, dar aceasta nu afectează în mod normal fertilitatea femelă. În consecință, plantele "masculine sterile" sunt capabile de a regla semințe care sunt rezultatul numai al polenizării încrucișate. Abilitatea de control în exprimarea acestor gene va da posibilitatea ca gametogeneza masculină să fie inhibată în producerea de semințe pentru culturi hibride fără a fi necesare procedee de masculinizare costisitoare, permițându-se însă o îmbunătățire genetică

a originii masculine prin programe convenționale de reproducere.

Controlul exprimării genetice, atât în cazul procariotelor, cât și în cazul eucariotelor, se relevă în primul rând prin interacțiunea proteinelor de reglare cu secvențele specifice de DNA. Dependent de natura acestor interacțiuni, transcripția de la promotorii având aceeași origine, poate fi,fie reprimată, fie activată. Într-adevăr, în unele cazuri aceeași proteină poate, fie să reducă, fie să crească transcripția conform naturii prin contactele realizate. Mai mult decât atât, abilitatea unor astfel de proteine de reglare pentru a lega secvențele lor orientate, este modulată prin legarea unor liganzi sau prin clivaj proteolitic specific. Astfel de mecanisme pot fi exploatate în vederea includerii inductibilității printre strategiile de reglare genetică a plantei.

Cele mai bine caracterizate sisteme de reglare sunt cele ale bacteriilor în care interacțiunile între proteinele legate de DNA (represoare) și secvențele de DNA orientate (operatoare) sunt înțelese în mare detaliu. O comparație a celui mai bine înțeles sistem incluzând represorii și croproteinele bacteriofagului λ și 434, represorul LacI și catabolitul proteinei de activare a genei (CAP), dezvăluiesc diferiți factori în comun. Aceste proteine de reglare se leagă ca dimeri sau ca tetrameri pentru operații scurte care prezintă un grad superior de simetrie a culorii. În majoritatea cazurilor, domeniul responsabil pentru recunoașterea DNA, care este separat de cel care se referă la oligomerizarea monomerilor, conțin o structură conservată de elice. O elice specifică în cadrul acestei structuri în fiecare monomer, elicea de recunoaștere, este aliniată cu canelura majoră a DNA și numai în cazul în care contactele specifice sunt formate între amino-acizii acestei elice de recunoaștere și bazele DNA adiacent, atunci complexul funcțional represor/operator, poate fi format. Astfel de interacțiuni sunt foarte specifice și complecșii cu afinitate superioară sunt formați cu o cinetică extrem de rapidă.

Cunoașterea mecanismului prin care exprimarea genei este reglată la eucariote este mult mai puțin detaliat. În celulele din drojdie și mamifere, un mare număr de porțiuni de legătură pentru proteinele de reglare putative, a fost identificat în secvențele promotoare și în anumite cazuri proteinele responsabile au fost de asemenea izolate. Totuși, numai în anumite cazuri, detaliile moleculare sunt cunoscute în ceea ce privește interacțiunile proteină DNA și mecanismul prin care transcripția este reglată.

În plante, reglarea exprimării genetice este înțeleasă numai la un nivel rudimentar. Diferite elemente de reglare au fost identificate în secvențele promotoare și unele proteine de reglare sunt examinate la un nivel preliminar. Totuși, astfel de proteine au trebuit încă să fie izolate și detaliile acestor mecanisme elucidate.

Sistemele de reglare eucariotice par să arate o diversitate de structură și un grad mai ridicat de complexitate decât părțile procariotice luate în calcul. De exemplu, controlul transcripției din promotorii eucariotici este astfel ca să cuprindă interacțiunea multor proteine (poate de ordinul zece) cu DNA reglator. Mai mult decât atât, cel puțin trei structuri diferite de proteine (helix-turn-helix, zinc-finger și zipper leucină) au fost implicate în specificitatea legăturii DNA cu diferiții factori de reglare eucariotică.

Proteinele legate de DNA constituie o clasă de proteine caracterizată prin abilitatea acesteia de a lega DNA al genelor pentru a se obține un efect al genei de represie sau de activare, la care acestea sunt legate. În afară de situația în care contextul o cere, astfel de proteine legate cu DNA vor fi în continuare numite, de convenienţă, ca simpli "represori".

Acest modul este apoi un recombinant genetic al plantei cuprinzând o genă represoare de origine bacteriană și un promotor care operează în plante pentru exprimarea motorie a genei represoare, această genă incluzând o proteină represoare capabilă de interacțiune cu o secvență operatoare asociată cu gena plantei selectate, orientate, astfel ca să se inhibe exprimarea de proteină represoare a genei plantei studiate.

Un vector, desemnat ca p35Slacl, conținând acest DNA, a fost depozitat într-o tulpină de *Escherichia coli* TG-2, din Colecția Națională de Bacterii Industriale și Marine, Limited, Aberdeen, Anglia la 12 decembrie 1988, sub numărul de acces NCIB 40092.

Un vector convenabil de transformare a plantei cuprinde *Agrobacterium tumefaciens* adăpostind plasmida menționată mai sus.

În cadrul unui mod de realizare specific a acestui modul, un sistem operator bacterian lacI este utilizat pentru reglarea exprimării genei. Lac represia poate fi relevată prin izopropil-tiogalactozida (IPTG) și alte zaharuri analoage.

În continuare, sunt date exemple referitoare la acest modul, aceste exemple fiind specifice.

Exemplul 3. *Construcția care exprimă lac represorul la plante*

Vectorii au fost construiți ca să exprime gena lacI, fie din promotori constututivi CaMV 35S găsiți în vectorul pJR1 sau din promotorul specific țesutului verde, promotorul porumbului CAB. Totuși represorul bacterian poate fi exprimat prin alte părți ale plantei astfel permițându-se controlul exprimării genetice a plantei în orice parte specifică a plantei.

(1.1.) Modificarea și inserția genei lacI represoare în pJR1

Represorul lac ($lacI^Q$) este corespunzător plasmidei pMJR 156. În vederea exprimării acestei gene în plante, codonul inițial de translație (GTC) a fost schimbat în ATC. În plus, este oportun să se creeze un clivaj enzimatic de restricție convenabil pe porțiuni pentru clonarea acestei gene în vectorul de exprimare al plantei. La capătul 3' al lacI există porțiuni de restricție convenabile (HindII și PstI) pentru inserția în vectorii de exprimare ai plantei. În vederea creerii unor porțiuni de restricție convenabile la capătul 5', se efectuează următoarele experimente:

(a) O porțiune de restricție Cfr 10 este localizată în poziția 134. pMJR este tăiat cu Cfr 10 și fragmentul sintetic de DNA reconstituie capătul N-terminual al genei lacI, codonul ATC de start translațional modificat, secvența de consens a plantei pentru inițiere translațională eficientă și porțiunea de restricție BamHI sunt inserate în pJR1. Secvența acestui fragment sintetic este următoarea: <u>BamHI consens</u>:

GATCC AACAATGGCT AAACCAGTAACGTTATACGATGTCGCAGAGTAT G
G TTGTTACCGA TTTGGTCATTGCAATATGCTACAGCGTCTCACA CGGCC Cfr 10

pJR1 este tăiat cu BamHI și PstI. Fragmentul sintetic descris mai sus și fragmentul Cfr10 până la fragmentul PstI conținând gena lacI sunt ligante la un loc cu vectorul tăiat pJR1 în condiții standard. Ligatura mixtă este transformată în Escherichia coli TG-1. Recombinanții sunt selectați pe plăcile conținând kanamicină. Aceștia sunt caracterizați prin analiza secvetei DNA. Construcția este desemnată ca p35Slacl.

(b) PCR (Reacția în lanț a polimerazei) așa cum este descrisă în Saiki și colaboratori, Science, 239, pag. 487-491 este utilizată pentru introducerea schimbărilor la capătul 5' al genei lacI în timp ce se menține secvența la capătul 3'. Două oligonucleotide sunt hibridizate în pMJR 156. Secvența oligonucleotidelor este următoarea:

(i) din capătul 5' al genei:

BamHI consens

GAGAGTAATTCAGGGT GGATCC AACAATGGCT
AAACCAGTAACGTTATACG

(ii) din capătul 3' al genei: CGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCC

Reacția PCR este efectuată în condițiile descrise. Produsul este tăiat cu BamHI (la partea nou introdusă) și PstI. Fragmentul rezultat este clonat în pJR1 tăiat cu BamHI și PstI. Recombinanții sunt indentificați prin analizele de hibridizare și restricție,utilizându-se protocoale standard. Una din clonele rezultate este caracterizată prin analiza secvenței DNA.

Ambele metode (a) și (b) dau aceeași construcție desemnată ca p35SlacI. Fig. 10 arată structura vectorului p35SlacI.

(1.2.) Înlocuirea promotorului CaMV 35 S cu promotorul CAB al porumbului

În vederea demonstrării utilității generale a sistemului represor(operator la plante, s-a construit un vector de exprimare care va permite inducția și exprimarea specific tisulară lacI la plante. Pentru această lucrare, s-a utilizat promotorul genei cuprinzând proteina (CAB) cu legătura a/b la clorofila inductibilă la lumină, la porumb.

Construcția acestui vector a fost obținută prin înlocuirea promotorului CaMV în p35SlacI cu promotorul CAB la porumb, secvența DNA care este dată în fig. 12, fiind găsită în vectorul pCAB48.1. Promotorul CaMV este îndepărtat prin restricția p35SlacI cu EcoRI și BamHI utilizându-se condiții standard. Promotorul CAB este izolat din pCAB48.1 prin restricția cu XbaI și Sau3A utilizându-se condițiile de restricție parțiale pentru Sau3A. Acest fragment promotor este apoi inserat la promotor mai puțin p35SlacI. Acest vector desemnat ca pCABlacI a fost caracterizat prin harta de restricție și analiza secvenței DNA.

(1.3.) Transformarea plantelor de tutun

Modulele de exprimare din vectorii descriși mai sus sunt transformați la BIM19 și apoi la tutun, utilizându-se transformarea frunzei pe disc, conform protocoalelor standard următoare.

Plasmidele sunt transferate la *Agrobacterium* utilizându-se transformarea frunzei pe disc prin împerechere triparentală. Agrobacteria este apoi purificată și utilizată în experimentele de transformare a frunzei pe disc. Un număr de 37 de plante conținând modulul de exprimare CaMV-lacI și 38 de plante conținând construcția BAB-lacI sunt regenerate și analizate pentru o exprimare relativă a lacI.

(1.4.) Analiza plantelor trasgenetice pentru exprimarea lacI

Exprimarea genei lacI a fost monitorizată utilizându-se analiza de tip Western a proteinelor extrase. Extractele sunt preparate, iar proteinele recuperate pe gelurile de poliacrilamidă și pentru prepararea analizei Western. Analizele au confirmat exprimarea construcției genei lacI în plantele transformate. Nivelurile diferite ale expresiei genetice lacI au fost observate la diferiți transformanți independenți. Rezultatele obținute pentru plantele transformate cu construcția CaMV-lacI sunt prezentate în tabelul IV de mai jos

Tabelul IV

Proba de plantă	Exprimarea lac (intensitatea bandei)
L1	-
L2	++
L3	-
L5	-
L7	-
L8	+++
L9	+
L10	+
L11	-
L13	+
L14	++
L15	-
L16	+++
L18	-
L22	+/-
L23	-
L24	++

Tabelul 4 (continuare)

Proba de plantă	Exprimarea lac (intensitatea bandei)
L25	+
L26	+++
L27	+++
L28	-
L29	++++++
L31	++
L32	++++
L33	+/-
L34	+/-
L35	++
L37	+

În acest tabel tabel - + ++++++ indică intensitatea bandei represorului lac din petele Western.

Exemplul 4. *(2.) Inserția operatorului lac în genele orientate*

(a) Promotorul CAB la porumb

Promotorul CAB la porumb poate fi găsit în plasmida pCAV48.1. și s-a descoperit că acest promotor poate dirija exprimarea genelor străine în sistemul de tutun cu exprimare trecătoare și în plantele stabil transformate. Această genă este, de aceea, un excelent model pentru demonstrarea controlului prin lac în niveluri ridicate de exprimare, ceea ce se poate obține, atât *in vitro*, cât și *in vivo*. În al doilea rând, promotorul CAB din alte sisteme (grâu, mazăre și tutun) au fost extensiv analizate în detaliu și raportate în literatura de specialitate. Informațiile publicate facilitează selectarea unor părți convenabile pentru inserția operatoare. În al doilea rând, p CAB48.1 este un promotor pentru porumb și utilizarea acestui sistem este importantă pentru demonstrarea aplicabilității prezentei invenții la plantele monocotiledonate, cum ar fi, de exemplu, porumbul, grâul, orzul și sorgul.

(b) Inserția operatoare lac la promotorul CAB la porumb

Lucrări relativ puține au fost raportate în ceea ce privește caracterizarea unor elemente importante cu acțiune *cis* a promotorului CAB. Astfel, s-a realizat un computer de cercetare comparând consensul elementelor de reglare inversă. (UREs) a diferitelor gene de plante față de promotorul CAB. Așa cum s-a anticipat, numeroase elemente de reglare inversă putative UREs au fost găsite în ambele fragmente ale promotorului CAB. Un număr de porțiuni potențiale pentru inserția operatoare au fost selectate, astfel:

1. 5' al cutiei CAAT;
2. Între cutia CAAT și cutia TATA;
3. În jurul cutiei TATA;
4. Între cutia TATA și punctul de start al transcripției și
5. Între punctul de start al transcripției și punctul de start de translație.

Se utilizează două metode pentru inserția operatoare lac în promotoul CAB la porumb și anume:

(1) inserția în porțiunile de restricție produse în mod natural;

(2) utilizarea reacției PCR pentru introducerea operatorilor în porțiunile selectate. Aceste metode sunt utilizate pentru inserția operatorilor lacI în porțiunile selectate.

Metoda (1)

Analiza secvenței promotoare arată că această regiune nu conține multe părți unice de restricție. Totuși, două părți pot fi convenabile prin simpla reclonare a regiunii promotorilor în diferiți vectori.

(a) Inserția între TATA și TSP

Enzima de restricție PvuII recunoaște o singură porțiune în fragmentul PstI de 2,8 kb conținând gena CAB. Porțiunea care se întinde între elementul TATA și punctul de start al transcripției (TSP) al promotorului CAB. Totuși, vectorul pCAB48,1 conține numeroase porțiuni PvuII (în pUC19). De aceea, fragmentul PstI de 2,8 kb este clonat în filamentul vectorului clonat pAT153 (căruia îi lipsește o porțiune PvuII), pentru a se obține pCABP1.

Secvențele operatoare sunt inserate în porțiunea unică PvuII în pCABP1. După

secvențializare, este posibil să se determine care clonă conține inserții operatoare simple și tandem. Operatorul sintetic simetric lac, necesar în această lucrare este prezentat mai jos și acesta este o pereche de baze palindrom care este analoagă cu operatorul mutant care leagă represorul lac de opt ori mai puternic decât operatorul de tip obișnuit.

lac operator-1

5'-ATTGTGAGCGCTCACATT-3'

(b) Inserția inversă a secvenței CAAT

Metoda utilizată este următoarea:

(i) pCAB48.1 este digerată cu HinfIII care taie în exterior regiunea promotoare și în pUC18 care se taie în sens invers față de porțiunea unică NcoI și în regiunea codificată. Astfel se obține un fragment cu o porțiune unică SphI inversă a jumătății CAAT.

(ii) pUC18 este digerat cu HindIII și BamHI și fragmentul promotor din (I) de mai sus este inserat pentru a se obține pCABp2. Digestia pUC18 cu BamHI îndepărtează porțiunea simplă SphI din polilinker. De aceea, pCABP2 conține o porțiune unică SphI în care operatorii pot fi inserați.

Operatorul utilizat în acest procedeu are secvența următoare:

lac operator-2

5'-ATTGAGCGCTCACAATCAT G-3'

3'-GTACTAACTCTCGCGAGTGTTA-5'

Este important de notat că asemănările (a) și (b) în secvențele operatoare nu determină inserarea directă în elementele de reglare putative, așadar activitatea promotorului este asemenătoare . fiind ușor afectată când secvențele sunt înserate la întâmplare.

Metoda (2)

Așa cum s-a arătat mai sus, secvențele operatoare pot fi inserate în două porțiuni de restricție convenabile. Inserția în alte porțiuni necesită alte metodologii.

Inserția între TSP și codonul ATG

Această inserție poate fi efectuată utilizându-se metoda PCR. Deoarece o porțiune unică PvuI se află închisă în regiunea TSP, aceasta se utilizează ca punct de referință pentru scopuri de subclonare. Materia primă pentru reacția -PCR- este pCABP1, astfel că, pAT 153 CAB reprezintă vectorul promotor construit așa cum s-a descris mai sus. O oligonucleotidă care se suprapune peste porțiunea PvuII și care nu conține nici o modificare este utilizată pentru începerea reacției de la un capăt:

CAB ologinucleotida-1

PuvII

5'-GG CAGCTG CTGTGTTCTGTTATGAC-3'

Cea de a doua oligonucleotidă se suprapune peste porțiunea NcoI și conține secvența operatoare menționată în continuare

CAB Oligonucleotida-2

NcoI Operatorul 1

5'-GATAG CCATGG TGGCGGCAGCCATGTCG ATTGTGAGGCGCTCACAAT

-ATCAGATCGTAGCTCCTTCTGATGC-3'

CAB Oligonucleotida-3

NcoI Operatorul 1

5'-GATAG CCATGG TGGCGGCAGCCATGTCG ATTGTGAGGCGCTCACAAT

Operatorul 2

- ATTGTGAGCGCTCACAAT ATCAGATCGTAGCTCCTTCTGATGC-3'

Urmând reacția PCR, DNA nou sintetizat este supus clivajului cu PvuII și NcoI. Fragmentul este apoi transferat pentru o digestie similară cu pCABP1 și secvențializat. O slabă diferență de asemănare care elimină faza de clonare intermediară în pCABP1 poate fi așadar utilizată. Aceasta cuprinde utilizarea unei oligonucleotide care se suprapune cu partea unică a XbaI în promotorul CAB împreună cu nucleotidele operatoare menționate mai înainte. Digestia DNA prin reacția PCR cu XbaI/NcoI are ca rezultat un fragment care poate fi direct clonat în

pCG1 și pCG2. Totuși, fragmentul Xbal până la Ncol din reacția PCR, este mult mai mare decât fragmentul Pvull până la Ncol obținut prin strategia de mai sus.

Inserția operator între CAAT și TATA
Se efectuează utilizându-se reacția PCR.
CAB Nucleotida-4

Xbal
5'CCCAAACAG TCTAGA TATGTTTCTC-3'

CAB Nucleotida-5

Pvull Operator
5'-CAGAACACAG CAGCTG CCTTTTAAAC ATTGTGAGCGCTCACAAT-
-AGTTGGGTTTGGATAGCAGGTCATC-3'

CAB Nucleotida-6:

Pvull Operator 1
5'-CAGAACACAG CAGTG CCTTTTAAAC ATTGTGAGCGCTCACAAT-
Operator 2
-ATTGTGAGCGCTCACACAAT AGTTGGGTTTGGATAGCAGGTCATC-3'

Urmând reacția PCR, DNA este digerat cu Xbal și Puvl și clonat în pCABP1 similar digerat. Clonele sunt din nou caracterizate prin secvențare și orice DNA apropiat este digerat cu Xbal și Ncol și clonizat în pCG1 și pCG2. Structura bazică a vectorilor este prezentată în figura 11.

Promotorul CAMV 35S

S-a descoperit că vectorul promotor mai slab 35S este un excelent receptor pentru inserția secvențelor de activare.

Operatorul lac poate fi inserat în acest vector, p-Δ-35S și odată inserat agentul de amplificare 35S este clonat 5' invers operatorului lac.

Exemplul 5. *(3) Controlul genei exprimată prin represorul lac*

(a) Controlul genei studiate exprimată în sistemul de exprimare tranzitorie

Plantele care exprimă constitutiv lac I transformată cu p35lacI pot fi preparate din protoplaști și utilizându-se metoda descrisă mai sus; ele pot fi testate pentru exprimarea proteinelor lac I. Construcțiile genetice menționate pot fi introduse apoi în protoplaști utilizându-se metode și protocoale standard. Protoplaștii din plantele netransformate pot servi drept control. Un alt control poate fi efectuat prin protoplaști din plantele care exprimă markerul GUS al genei, sub controlul promotorului CAB fără inserțiile operatoare.

(b) Inducția genei exprimate utilizând IPTG

IPTG se poate utiliza pentru a efectua represarea prin represorul lac. Astfel, se formează un sistem genetic comutator.

(c) Modularea exprimării genei țintă

Interacțiunile represor/operator lac pot regla inferior exprimarea genei marker în plante la diferite nivele. Acesta este un efect important prin aceea că pot exista situații în care un grad diferit de reglare inferioară este necesar.

(d) Controlul exprimării genei țintă în plante stabil transformate

Luând în considerație descrierea de mai sus, represorul lac poate regla inferior promotorul CAB care dirijează exprimarea GUS în protoplaști, construcțiile de inserție opereatoare convenabile pot fi transferate la plantele de tutun prin metodele descrise mai sus. Plantele regenerate pot fi încrucișate cu plante exprimate lacI așa cum s-a descris mai sus, care exprimă represorul lac sub controlul promotorului constitutiv CaMV35S.

Plantele pot fi construite așadar ca să exprime gena lacI sub controlul promotorului CAB cu inducție de lumină, la porumb. Aceste plante pot fi încrucișate cu plante care conțin gena marker GUS din promotorul CaMV conținând inserția operatoare lacI.

Inserția operatorilor multipli în promotorul CAB

Utilizându-se tehnici similare cu cele descrise pentru inserția operatorilor simpli, operatorii multipli pot fi inserați în promotorul studiat. Aceasta poate fi realizată fie prin inserția unor copii multiple al operatorului la una din părți sau se utilizează combinația de fragmente a promotorului în care operatorul este inserat la diferite porțiuni în promotor, obținându-se astfel vectorii în care operatorii multipli sunt localizați în multiple locuri în promotor.

Al doilea mod de realizare

În acest mod de realizare a metodei de reglare a exprimării genei se include localizarea interioară sau inserția în genă a secvenței pseudo-operatoare și se prevede o reglare a mutantului gemei cuprinzând un represor având o secvență de aminoacid care se leagă la pseudo-operator.

Celulele conținând interacțiunea represoare și genele operatoare pot fi izolate printr-o metodă care cuprinde prepararea plasmidei recombinante conținând (1) *Escherichia coli* lac operon, care include lacZ, lacY și lacA ca tipuri de gene și (2) o genă care include o proteină represoare, inserând această plasmidă în gazda bacteriană și prin cultivarea acesteia în prezența ortonitrofenil-1-tio-β-galactozidazei sau *para*-nitrofenil-1-tio-β-galactozidazei și prin aceasta dezvoltarea celulelor în care exprimarea genei lac nu este reprimată prin represor, menționată fiind molecula care este inhibată în dezvoltarea celulară în care legătura represor/operator se produce fără a fi inhibată și astfel se recuperează celulele la care caracteristicile de dezvoltare nu sunt inhibate.

Represorii mutanți pot fi utilizați sau un pseudo-operator potențial poate fi inserat în regiunea operatoare a operonului lac: pseudo-operatorul potențial exogen este preferabil de origine vegetală.

O gazdă bacteriană convenabilă este *Escherichia coli*

Astfel, există mijloace de schimbare a represorului de exprimare a genei cuprinzând genele care trebuie inactivate. Pseudo-operatorii sunt secvențe de DNA care mențin simetria generală de diadă a operatorului dar care conține baze constituiente diferite. Analiza computerizată a secvențelor cunoscute de DNA a genei GPAL2 a fasolei franțuzești, printre multe altele, a promotorului și genelor C-myc de la mamifere, a revelat un număr de posibili pseudo-operatori la diferiții represori bacterieni.

Plasmida pGAL2 a fost depozitată într-o tulpină de *Escherichia coli* DH5 la 6 decembrie 1988 în Colecția Națională de Bacterii Industriale și Marine de la Aberdeen, Marea Britanie sub numărul de acces NCIB 40087.

Astfel, este probabil ca secvențele "pseudo-operatoare" să poată fi găsite în toate genele. În general, apoi, un pseudo-operator este o secvență de DNA prezentă într-o poziție convenabilă în genă, incluzând o genă de plantă la care represorul legat va duce la inhibarea de exprimare a genei.

Plasmida pAD18 a fost depozitată în condițiile Tratatului de la Budapesta, într-o tulpină de *Escherichia coli* DH5α, gazda fiind Colecția Națională de Bacterii Industriale și Marine, Limited, Aberden, Anglia, la data de 21 decembrie 1988 sub numărul de acces 40096.

Plasmida pPS1 a fost depozitată în condițiile Tratatului de la Budapesta într-o tulpină de *Escherichia coli* DH5α, în Colecția Națională de Bacterii Industriale și Marine.

Procedeul este așadar aplicabil la moleculele de proteine care conduc la o creștere a activității genetice, în special, selecția de proteine represor/activator care răspund la substanțele chimice specifice. Domeniile de legătură pentru aceste substanțe chimice pot fi selectate și manipulate în mod specific pentru a permite generarea efectului chimic specific proteină/DNA în combinațiile care sunt de uz biotehnologic, de exemplu, sub forma unui pachet chimic de comutare utilizat pentru controlul reglării genetice a plantelor prin aplicarea unui inductor chimic exogen.

Mutațiile care afectează represorii și operatorii se produc *in vivo*. S-a arătat că represorii care au specificitățile de recunoaștere a DNA modificate, pot fi

prelucrați *in vivo*. Procedeul depinde apoi de abilitatea mutanților represori rari de comutare a genei letale condiționate prin legarea la secvențele pseudo-operatoare pe care represorii nativi nu le pot recunoaște.

Un mod de realizare al prezentei descrieri de invenție va fi descrisă în continuare prin ilustrarea următorului exemplu, cu referire la desenele însoțitoare care reprezintă două serii de plasmide desemnate ca pPS și pAD și variantele lor.

Exemplul 6. *Se demonstrează sistemul de selecție al prezentei descrieri de invenție al fagului represor 434. Totuși, în principiu orice alt represor poate fi adaptat pentru acest sistem de selecție.*

1. Sistemul de selecție

S-a desemnat un sistem de selecție care poate fi utilizat pentru selectarea mutanților într-o gamă largă de sisteme operator. Sistemul de selecție cuprinde un set de plasmide și gazde asemănătoare cu *Escherichia coli*, ca și un protocol de selecție a substratului suicidic adaptat pentru plasmide și gazde.

În forma sa finală, acest sistem depinde de abilitatea mutanților represori rari pentru comutarea unei gene letale condiționate prin legarea la un "pseudo-operator", la care însă nu se poate lega un represor de un oarecare tip. Sistemul de selecție descris mai jos conține caracteristici care măresc frecvența unor astfel de mutanți represori care trebuie identificați în populația finală celulară.

Procedeul de selecție este bazat pe operatorul lac al *Escherichiei coli* și pe utilizarea unui substrat suicidic de *para*-nitrofenil-1-tio-β-D-galactozid (TPNPG). Operonul lac (care conține trei gene lacZ, lacY și lacA) este controlat prin legarea represorului lacI la secvența operatoare lacO, situată între partea de start de transcripție și gena lacZ. Produsul genei lacY, lactoza permează este responsabil pentru absorbția activă a lactozei și a compușilor menționați în citozolul în care aceștia sunt hidrolizați de către β-galactozidază (produsul genei lacZ) pentru a se forma galactoza și glucoza.

Sistemul de selecție pozitivă exploatează descoperirea faptului că, dezvoltarea celulelor care exprimă gama lacY este selectiv inhibată în prezența TONPG sau TPNPG, probabil printr-o pierdere inutilă a energiei metabolice în transportul său. Selectivitatea acestor compuși a fost demonstrată a fi crescută când se utilizează succinatul ca sursă de carbon.

Selecția rațional întârziată se bazează pe abilitatea represorului 434 de legare a secvențelor pseudo-operatoare inserate în promotorul cu exprimare dirijată a casetei de gene lac. În absența complexului represor 434/operator, operorul lac va fi exprimat și în prezența TPNPG, se va obține ca rezultat, moartea celulelor. Dimpotrivă, în prezența complexului, permeaza lacY nu va fi exprimată și substratul suicidic TPNPG nu va fi capabil să pătrundă în celule. În consecință, în analiza finală, pseudo-operatorul ales din secvența naturală a genei plantei menționate, se va clona în porțiunea SalI și se va combina cu grupa genelor cuprinzând represorii 434 în care anumiți aminoacizi în elicea α3 sunt substituiți la întâmplare. Numai acele celule care exprimă represorul mutant care este capabil de legare la pseudo-operatori și în consecință reprimă exprimarea lacY, vor fi selectați în prezența TPNPG.

2. Plasmidele 2.1. Construcția pAD18 și a derivaților acesteia

O serie de plasmide au fost dezvoltate pentru utilizare în aceste experimente. Prototipul utilizat este pAD18, al cărui desen este prezentat în fig. 13. Acest vector este bazat pe un replicon din pSC101 care este cunoscut a fi stabil menținut în *Escherichia coli* și a avea un număr mic de reproducere. Aceasta este important deoarece supraexprimarea proteinelor legate de DNA poate avea efecte dăunătoare asupra dezvoltării gazdei. Dacă aceasta constituie o problemă în unele experimente, este de dorit să se transfere genele care conțin secvența pAD18 în vectorul bacteriofag pentru inserție în genomul bacterian, ca simplă genă de reproducere.

Secvența pAD18 are un reper selectabil de kanamicină pentru menținerea în speciile de *Escherichia coli*.

Secvența pAD18 conține așadar operonul lac. Genele lacZ și lacY sunt prezente sub controlul promotor/operator. În operatorul lac, o porțiune de restricție Sall a fost prelucrată, aceasta fiind utilizată pentru inserția operatorului 434 sau a derivaților de pAD18, a operatorilor mutanți 434 sau a "pseudo-operatorilor" selectați. Această porțiune a fost astfel poziționată ca ea să nu interfereze cu exprimarea operonului lac din promotorul lac prin obstacolele sterice când represorul este suficient sintetizat ca să se lege la operatorul clonat la acea porțiune. Acele baze au fost schimbate în porțiuni de restricție Sall care sunt cunoscute ca nefiind în contact cu RNA polimeraza. Astfel, exprimarea operonului va fi manipulată sub controlul represorului 434, pAD18 care conține operatorul 434 de un tip oarecare care este astfel prototipul acestor serii de plasmide.

Secvența pAD18 conține o genă rezistentă la tetraciclină, în care gena represoare de tipul 434 sub controlul promotorului lacUV5 poate fi inserată pentru un nivel superior de exprimare. Acest vector este denumit pPS1. În continuare sunt descriși alți derivați.

În alt vector, represorul 434 a fost modificat astfel ca secvențele Kpn1 și Not1 să fie introduse pe porțiunea de DNA legată la elice, iar secvența nativă de amino acid în această regiune a fost păstrată. Este așadar posibil să se insereze în această genă represoare 434, la întâmplare, oligonucleotide care vor genera molecula represoare 434 care exprimă domenii de legătură cu DNA modificate, sistemul de selecție care utilizează substratul suicidic va permite apoi selecția acelor mutanți represori 434 care se leagă la pseudo-operatori". În unele circumstanțe, se va face referire la presiunea de selectare pentru izolarea mutanților represori. Cu toate acestea, sistemul așa cum se prezintă, este dependent de raportul exprimare/represie a permeazei lacY pentru izolarea mutanților represori.

Astfel, există porțiuni convenabile clonate în pAD18 și derivați ai acestora pentru inserția genelor operatoare sau represoare. Operatorii pot fi clonați în vectori precursori ai pAD18, în special, pEW283, din care operatorul care conține fragmentele EcoR1 până la Pst1, poate fi apoi excizat și clonat în fragmentele EcoRL și Pst1 digerate pAD18 (vezi fig. 13).

Unul din obiective este acela care arată că exprimarea operonului lac efectuată prin plasmide așa cum s-a descris mai înainte, ar putea fi controlată prin interacțiunile represor 434/operator. Pentru a demonstra aceasta, trei plasmide sunt construite, în care operatorii 434 realizați de pAD16, 17 și 18 sunt combinați cu gena 434cI de tip obișnuit, pe pAD15.2. Fragmentul mare Xhol/Sst1 (9,4 kb) din pAD15,2 a fost purificat și legat la fragmentul mic Xhol/Sst1 (3,7 kb) purificat din pAD16, 17 și 18 pentru a forma plasmidele pPS2, pPS3 și respectiv pPS1. Analizele de restricție a plasmidei DNA este izolată din diferiți tranformanți, din fiecare legătură care arată că, toate plasmidele pPS au o structură generală prevăzută. Structura acestor plasmide este arătată în fig. 13.

Integritatea operatorilor efectuată prin pAD și plasmidele pPS a fost controlată prin secvențializare. Inițial aceasta s-a obținut prin izolarea a aproximativ 200 perechi de baze din EcoRI/fragment PstI care formează totalul promotorilor lac și capătul 5' al genei lacZ din fiecare din plasmidele pAD și pPS și subclonarea lor în polilinkeri ai M13mp18. Modelul cu o catenă este purificat și secvențializat conform protocoalelor standard. În mod alternativ, acest procedeu laborios de subclonare este evitat prin utilizarea secvențializării plasmidelor. Aceste analize arată că secvența operatoare potrivită 14 mer este prezentă în porțiunea Sall în toate plasmidele relevante. Prezența altor caracteristici frapante ale promotorului lac a fost, așadar, confirmată.

2.2. Plasmidele pPS care codifică represorii 434 funcționali

Pentru vizualizarea represorului 434 produs prin pAD15,2 și plasmidele pPS, extractele totale de proteine sunt preparate din culturi mid-log dezvoltate în condiții selective. Continuând electroforeza

în gel de poliacrilamidă și colorarea cu albastru briliant Coomassie (G250)nici o proteină care corespunde dimensiunii represorului, nu s-ar putea observa în mod specific în speciile care conțin gena 434cI. Totuși, alte experimente au arătat că 1 µg din represorul purificat este vizibil numai utilizând această tehnică relativ, insensibilă. De aceea, pentru detectarea represorului 343 în cantitatea extrasă, se utilizează la nivelul de exprimare de cel puțin 1% din proteinele totale celulare așa cum ar fi necesar. Baza altor proteine de dimensiuni similare face așadar, dificilă detectarea. În cosecință, se utilizează o tehnică de absorbție Western mult mai sensibilă. Primul anticorp necesar pentru detectarea represorului 434 prin metoda de absorbție Western este preparat prin injectarea la iepuri a unui represor purificat intact 434. Specificitatea acestui antiser policlonal a fost demonstrată utilizându-se represorul purificat și extractele tulpinilor de *Escherichia coli* cu gena 434cI nutritivă. La soluții diluate ale antiserului au fost detectate diferitele proteine obținute din extractele bacteriene, incluzând represorul 434. Cu toate acestea, o diluare în continuare a antiserului rezultat numai în represorul 434 rămâne detectabilă, specificitatea maximă fiind observată la diluții cuprinse între 1/10000 și 1/20000.

Sensibilitatea tehnicii de absorbție Western utilizând această preparare de anticorpi și tehnica de detectare a peroxidazei conjugate de ridiche, se evaluează prin extractele de celule brute "țintuite" de 63000Δlac4169 care nu conțin gena 434cI, cu diferite cantități de represor purificat. În condiții standard, 5ng represor în 50 µg de extract ar putea fi în mod real detectate, această sensibilitate corespunzând la un nivel de exprimare de 0,01% din totalul proteinelor celulare.

Utilizând același anticorp primar în tehnica de absorbție Western pentru tulpinile purtătoare de 6300Δlac4169 testul plasmidelor, duce la concluzia că celulele de depozitare pentru pAD15.2, pPS2 și pPS3 sintetizează toate represor 434. Determinarea intensităților relative ale benzilor obținute, utilizându-se un densimetru analizor, arată că toate patru speciile, conțin aproxiamtiv 0,4% din totalul proteinelor celulare, ca represor 434.

În final, abilitatea represorului 434 de legare a secvențelor operatoare de tip obișnuit, este determinată în analiza funcțională utilizându-se bacteriofagul 434cI, 434vir și λcI. În ciclul de viață a acestor fagi, legarea represorului apropiat la operatori în promotorul P_R reprimă transcripția genelor responsabile de liza celulară. În consecință, celulele care sintetizează endogen represorul cI, sunt imune la liză prin fagul corespunzător, datorită inhibării genei litice exprimate deja prin represorul existent. Deoarece fagul mutant cI este incapabil de sintetizare a represorului, fenotipul litic după infectare cu acești fagi, este diagnosticat pentru absența represorului în celula gazdă. Operatorul P_R a mutantului fagului vir a redus afinitatea pentru represor, cu consecința că la nivele scăzute de represor endogen, acest fag este litic, pe când la concentrații mai mari ale represorului, suprainfectarea este inhibată.

Rezultatele încrucișării liniare a acestor fagi cu tulpinile testate arată că celulele de depozitare ale plasmidelor pPS sunt imune la suprainfectare cu 434cI și respectiv 434vir, dar sunt sensibile la λcI. Tulpinile care poartă alte plasmide pAD sunt sensibile la toți trei fagi. Aceasta indică clar că, celule care poartă plasmidele pPS sintetizează niveluri ridicate de represori 434 care sunt funcțional capabili de legături cu operatorul și care inhibă trasncripția de la P_R. Mai mult decât atât, specificitatea acestei interacțiuni represor/operator este demonstrată prin incapacitatea represorului 434 de a lega operatorii λcI, care au o secvență diferită de cea a represorului 434, rezultând din liza celulară .

În rezumat, toate trei plasmidele pPS sunt determinate a fi de construcție corectă, pentru a purta secvența operatoare 434 așteptată și de a sinteriza represorul funcțional 434.

2.3. Îmbunătățirea vectorului

Așa cum s-a indicat mai sus, o proporție din populația de pAD și plasmida conținută în tulpinile menționate, formează colonii albe după selecție. Mai mult decât

atât, s-a observat că, dacă tulpinile care conțin aceste plasmide se păstrează pe medii selective timp de câteva luni, când este necesară subcultivarea, proporția de colonii albe în populație, crește.

Se presupune că aceste colonii albe poartă plasmidele în care o parte din toți operonii lac sunt trasnformați sau șterși. Metoda uzuală de minimalizare a acestor probleme este de a utiliza o tulpină de recombinare deficientă. Mai mult decât atât, combinația de alele Δlac4169 și recA56 face tulpina inviabilă în prezența TPNPG, motivul fiind încă neclar. De aceea, atenția este îndreptată către o sursă probabilă de schimbări recombinatorii. Este de notat că promotorii de exprimare a operonului lac și gena represorului 434 în plasmidele pPS sunt ambele derivate din promotorul lac și în consecință secvențele sunt foarte similare. Recombinarea între aceste secvențe ar rezulta în ștergerea operonului lac rezultând că, secvențele de origine și gena rezistentă la kanamicină trebuie să rămână în condiții selective impuse.

În timpul construcției de pAD15.2, gena 434cI este transferată de la plasmida pRP42 la fragmentul Sau3A de 1kb. Codoul de stopare a represorului 434 citit mai înainte coincide cu porțiunea Sau3A la partea din dreapta a acestui fragment, și în consecință gena clonată în pAD15,2 nu poartă vreun semnal terminal de transcripție. Mai mult decât acest fragment Sau3A poartă așadar un rest de pBR322, incluzând promotorul genei rezistente la ampicilină. De aceea, pentru a rectifica aceste probleme, se modifică secvența codificată 434cI în ambele sensuri de acțiune, ascendent și descendent. Regiunea ascendentă este înlocuită cu promotorul triptofan și secvența de consens Shine-Dalgarno uzează oligonucleotidele corespunzătoare. Aceste elemente previn recombinarea intra-plasmatică și se separă promotorul genei rezistentă la ampicilină. Terminatorul rrn T1 este așadar introdus la capătul 3' al secvenței codificate 434cI pentrtu terminarea tanscriptorilor genei 434cI. Acest terminator rho-independent este ales deoarece activitatea sa de terminare bi-direcțională raportată va evita orice distrugere a expresiei 434cI din transcriptorii de opoziție inițiați oriunde în vector ca și transcriptorii de terminare 434cI.

2.4. Construcția plasmidei pTP1

Oligonucleotidele sunt utilizate pentru introducerea secvenței promotoare trp de tip obișnuit la un loc cu secvența consens Shine-Dalgarno (AGGAGGT) cinci perechi de bază ascendente ale genei 434cI în porțiunea inițială translațională. Acest interval duce la o activitate translațională maximă a genei 434cI. Datorită lipsei porțiunilor de restricție convenientă la startul genei 434cI sunt utilizate perechile de baze în număr de 33 ale porțiunii EcoRI din interiorul secvenței codificate. Aceasta duce la necesitatea includerii capătului 5' în regiunea codificată în oligonucleotidă. Secvența necesară are o lungime de 126 perechi de baze și este astfel construită din patru oligonucleotide suprapuse. Urmând normalizarea acestor oligonucleotide, fragmentul duplex de 126 perechi de baze este izolat și clonat în vectorul pUC19 clivat EcoRI. Urmând selecția transformanților pe mediul care conține ampicilină și BCIG, DNA din diferitele colonii albe este secvențializat utilizându-se protocoale de secvențializare a plasmidelor. Această structură confirmată a secvenței de promotor este cea așteptată.

2.5. Construcția de pTT1

Secvența terminatorului rrn R1 are o lungime G≡C cu o structură bogată a tulpinei flancată prin lungimea A=T cu regiuni bogate, făcând un terminator puternic pentru transcriptori în ambele sensuri. Datorită naturii repetate invertite a secvenței, aceasta s-a inserat utilizându-se patru oligonucleotide rezolvând orice problemă de autonormalizare în fiecare filament. Oligonucleotidele sunt normalizate în perechi și fragmentul rezultat de DNA dublu catenar este izolat separat și ligat la EcoRI/HIndIII clivat la DNA pTP1, înainte de tranformarea celulelor rezistente la ampicilină. Secvența structurii terminatoare inserate a fost stabilită.

2.6. Construcția plasmidei pTRT1

Sursa genei 434cI care trebuie clonată alături de promotorul trp, este

plasmida pRP42-76. Mutațiile atone au fost introduse utilizându-se mutageneza *in vitro* pentru crearea porțiunilor de restricție pentru KpnI și XmaII pe celalată porțiune a secvenței codificate pentru elicea de recunoaștere *alfa*3. Aceata va permite ulterior introducerea oligonucleotidelor în care anumite codoane în elicea *alfa*3 au fost mutate la întâmplare. Fragmentul EcoRI/Sau3A (aproximativ 600 de perechi de baze) poartă gena 434cI izolată și clonată în EcoRI/BgIII clivat pTP1. Aceasta schimbă 434cI citit deschis exact în față și codonul translațional de stopare este reținut în joncțiunea Sau3A/BgIII. Odată izolată, caseta trpP-434cI-rrnT1 este clivată spre exterior utilizându-se porțiunile BamHI în polilinkerii introduși la unul din capetele casetei și se utilizează pentru înlocuirea genei existente 434cI în plasmidele pAD și pDS.

Secvența promotorului trp utilizată pentru construcția pTRT1 este legată prin represorul trp în prezența triprofanului pentru inhibarea trasncripției. Porțiunea de legătură pentru acest represor este intenționat reținută în vederea faptului că exprimarea genei 434cI poate fi controlată, dacă este necesar într-un viitor experiment. Totuși, în vederea permiterii sintezei convenabile a represorului 434, speciile vor fi construite astfel, încât gena trp R a fost eliminată din cromozomi.

3. Protocolul de selecție. 3.1. Selecția prij utilizarea TONPG

Un protocol de selecție TONPG (*orto*-nirofenil-b-tiogalactozida) este desemnat astfel ca să se permită selecția pentru clonele în care un represor mutant se leagă acum de operatorul mutant 434 rezultând în reprimarea expresiei lacY (de exemplu, selecția prin reprimarea inhibiției condiționale).

TONPG inhibă dezvoltarea celulelor de *Escherichia coli* care se exprimă prin gena permeazei lac. Lucrări efectuate mai înainte cu o simplă reproducere lacY + *Escherichia coli* indică faptul că aceste celule sunt sensibile la maxim la TONPG 500 până la 1000 µg/l când are loc exprimarea lacY în mediul minim de succinat. Experimentele mixte arată că TONPG ar putea fi utilizate pentru selectarea celulelor lacY din amestecuri de populații lacY+/-. Aceste experimente sunt repetate cu plasmidele lacY + și lacY - pAD. Selecția TONPG va acționa numai în gazda lac de *Escherichia coli*. Gazda preferată este descrisă mai departe. Cele mai bune rezultate ale testării sunt obținute în culturile lichide, dar acestea se pot efectua și pe plăci cu agar. Selecția pe mediu solid se testează mai bine cu galactozidă analogă diferită, *para*-nitrofenil-beta-tiogalactozida (TPNPG). Utilizându-se TONPG în culturile lichide și pe discurile cu TPNPG, selecția normală se obține la o îmbunătățire cu 6 log a plasmidelor lac-pAD prezente în populația inițială.

3.2. Gazda Escherichia coli

Gazda bacteriană a fost astfel selectată ca să se permită selecția prin TONPG. Aceasta necesită abilitatea gazdei de a se dezvolta într-un mediu minim de succinat. Gazda specială utilizată în acest exemplu este una din care operonul lac întreg a fost eliminat lacΔ4129. În orice caz, alte gazde mutante corespunzătoare pot fi utilizate, de exemplu laci$^-$, lacY$^-$. O tulpină potrivită a fost construită de la tulpina W1485 (CGSC6300) derivată care a fost ștearsă pentru întregul operon lac, utilizând transducția transpunerii înlănțuite P_1.

3.3. Selecția utilizând TPNPG

Pentru testarea abilității TPNPG la selecția celulelor lac$^-$ din celulele de bază lac$^+$, se amestecă experimentele cu culturile de 63oolac$^+$ și derivații acesteia Δlac4169 care sunt perfomați. Aceste specii sunt dezvoltate în faza mid-log în prezența a 1mM IPCT pentru introducerea exprimării operonului lactozei. Două culturi sunt amestecate în diferite proporții înainte de diluțiile corespunzătoare pe discurile conținând cantități minimale de săruri succinați, aceste discuri conțin 1 mM IPTG și 50 µg/l BCIG, ambele cu și fără TPNPG.

Experimentele inițiale arată că o cantitate de 500 µg/ml TPNPG este o cantitate capabilă pentru retardarea dezvoltării celulelor lac$^+$, permițându-se formarea coloniilor mici albastre după un timp de 48 h la temperatura de 28°C. Totuși, aceată bază este eliminată în prezența a 1 mg/ml de TPNPG, rezultând

în niciuna din celulele lac$^+$ de pe discuri (peste 7×10^{-7}) fiind capabile de formarea coloniilor albastre (vezi tabelul V). În contrast cu acestea, această concentrație de TPNPG nu afectează notabil viabilitatea celulelor lac$^-$. Aceasta demontrează puterea mare de selectivitate a celulelor TPNPG în raport cu lac$^+$, chiar atunci când

gena lacY este cromozomială și aceasta la un număr scăzut de copieri. În acest sens, numărul ridicat de copieri permite astfel creșterea nivelului de exprimare a genelor lac pe plasmidele pPS care ar rezulta printr-o creștere vastă a energiei luate pe TPNPG, făcând astfel omorârea celulelor lac$^+$ mult mai efectivă.

Tabelul V

Abilitatea TPNPG pentru selecționarea celulelor lac$^-$ dintr-o bază de celule lac$^+$

Gradul aproximativ al celulelor de pe discuri lac-:lac+	Coloniile formate per mililitru -TONPG		+TONPG	
	alb	albastru	alb	albastru
1 : 102	1,1×102	2,0×104	1,2×102	0
1 : 103	1,3×102	2,0×105	1,2×102	0
1 : 104	N.D.	1,8×106	1,1×102	0
1 : 105	N.D.	1,5×107	1,1×102	0
1 : 5 × 105	N.D.	7,0×107	1,2×102	0

În care N.D. = nedeterminabil.

Efectul TPNPG pe celulele supraviețuitore 6300Δlac4169 purtând diferite plasmide pAD și pPS este testat prin diluții potrivite pe discuri din culturile de medii așa cum s-a descris mai înainte. Aceste rezultate din două experimente arată că toate plasmidele rezultă din formarea coloniilor albastre și albe în prezența TPNPG, nefiind detectate încă nici o colonie albă în absența sa (vezi tabelul VI).

Tabelul VI

Plasmida purtată	Coloniile per mililitru -TONPG		+TONPG	
	alb	albastru	alb	albastru
Expt +1				
-	2,8 × 108	0	3,0 × 108	0
pAD16	N.D.	3,5 × 108	1,2 × 103	2,0 × 103
pAD17	N.D.	2,3 × 108	1,3 × 104	1,6 × 103
pAD18	N.D.	2,3 × 108	2,3 × 103	2,2 × 103
pPS1	N.D.	3,8 × 107	2,0 × 104	2,7 × 107
pPS2	N.D.	7,2 × 107	7,0 × 102	4,8 × 107
pPS3	N.D.	5,6 × 106	2,0 × 104	2,0 × 101
Expt + 2				
-	1,3 × 108	0	3,0 × 108	0
pAD16	N.D.	2,9 × 108	1,1 × 104	4,2 × 102
pAD17	N.D.	3,4 × 108	6,7 × 103	5,9 × 103
pAD18	N.D.	2,7 × 108	4,1 × 103	2,5 × 103
pPS1	N.D.	4,2 × 107	8,5 × 103	1,2 × 107
pPS2	N.D.	8,4 × 107	5,2 × 103	1,6 × 107
pPS3	N.D.	5,8 × 107	5,7 × 103	6,3 × 101

N.D. = nedeterminabil.

Așa cum deja s-a observat, toate plasmidele pAD și pPS dau colonii albastre pe medii care conțin BCIG, respectiv în prezența interacțiunilor 434 represor/operator. De aceea probabil, coloniile formate trebuie să rezulte din celulele care poartă plasmidele care au fost trasnformate și eliminate pentru a reda celulele efective lac$^-$. Frecvența relativ scăzută cu care aceste colonii albe se produc (aproximativ 10^{-5} din celulele de pe plăci) arată că, pe mediul lipsit de TPNPG, acestea ar rămâne nedetectate în majoritatea coloniilor albastre. Analiza plamidelor depuse în celule cum ar fi cele din coloniile albe relevă deleții (așa cum s-a menționat mai sus).

În prezența TPNPG frecvența coloniilor albastre formate din speciile care poartă pAD, este redusă la 10^5 până la 10^6. Aceasta reprezintă distrugerea prin TPNPG a majorității populației care adăpostește operonul lac nerepresat. Specia care poartă pPS3 este așadar distrusă de un lanț similar în prezența TPNPG, așa cum era de așteptat după cum s-a arătat deja că represorul 434 este incapabil de inhibare a transcripției genelor lac în această plamidă. Totuși, în toate cazurile, un număr rezidual de colonii albastre sunt obținute în prezența TPNPG, la o frecvență de aproximativ 10^{-5} din celulele de pe plăci. Se prevede că, aceste colonii reprezintă în primul rând celule care adăpostesc plasmidele mutanți lacY$^-$, deoarece s-a demonstrat deja că puterea de selectivitate a TPNPG este suficientă pentru a distruge vasta majoritate a celulelor de pe plăci, rămânând totuși celulele lac$^+$. Deoarece experimentele de mai înainte nu au nici o indicație privind frecvența superioară de mutație pentru gena lacY mărginită cromozomal, se presupune că recombinantul intraplasmatic este responsabil de numărul de mutanți aparent ridicat. În lucrarea menționată mai înainte, s-a indicat că aceste plasmide sunt expuse la instabilitate în tulpinile rec$^+$ și că tulpina 6300Δlac4169 recA56 care ar putea fi utilizată pentru prevenirea unei astfel de recombinări, este inviabilă pe TPNPG. Cu toate acestea, în contrast puternic cu alte tulpini,majoritatea vastă a acestor celule conținând pPS1 sau pPS2 supraviețuiesc în prezența TPNPG, numărul de colonii albastre fiind redus de numai 2...5 ori, această reducere fiind cel puțin pentru pPS1. Acest fapt se corelează clar cu reducerea emfatică în activitatea β-galactozidazei și de aceea este așadar de presupus că exprimarea lacY a fost deja demonstrată pentru aceste plasmide. De aceea, concluzia importantă care poate fi trasă este aceea că interacțiunea între represorul 434 și operatorul său cunoscut este capabil de a reduce exprimarea genei lac în măsură suficientă pentru a permite ca majoritatea celulelor să supraviețuiască procedeului selectiv.

4. Selecția represorilor specifici modificați.

4(a) Selecția represorului modificat 434

Gena 434 care a fost modificată pentru facilitarea mutagenezei randomizate a represorului 434 legând domeniul de inserție și oligonucleotidelor randomizate, a fost descrisă în Wharton și Ptashane, Nature 316, 601-605. Gena represoare 434 a fost mutată prin introducerea clivajului la porțiunea enzimei de restricție KpnI și NotI pe altă porțiune a elicei de recunoaștere a DNA, în timp ce se conservă secvența de aminoacizi nativă. Seriile de oligonucleotide au fost sintetizate cu capetele coezive corecte și conținând mutații cu diferite frecvențe distribuite randomizat prin elicele *alfa* de recunoaștere a DNA. Aceste oligoamestecuri au fost clonate între capetele coezive KpnI și NotI ale genei represoare modificate. În mod alternativ, secvența "dirty oligo" asemănătoare a fost utilizată pentru generarea oligoamestecului cu substituții de bază în poziții corespunzătoare din domeniul de legătură al DNA.

4(b) Selecția represorului 434 modificat prin recunoașterea pseudo-operatorului găsit în genele plantei

Un pseudo-operator produs în mod natural a fost utilizat pentru selectarea represorului modificat. Orientarea în acest experiment a fost către gena GPAL2 din fasolea franțuzească, clorofila a/b care leagă gena proteinei din porumb și altele. S-a identificat prin analiza computerizată,

că diferiți pseudo-operatori potențiali 434 au fost localizați în regiunea genei GPAL2. Aceste regiuni ale promotorului GPLA2 au fost utilizate pentru selecționarea unei specificități modificate a represorului 434. Secvențele "pseudo-operatoare" sunt inserate în regiunea -10 până la -35 a promotorului lac care dirijează genele lacZ/lacY. Oligonucleotidele pătate sunt inserate în regiunea genei represoare 434 și amestecuriule sunt transformate în *Escherichia coli* 6300. Protocolul de selecție este aplicat și coloniile sunt izolate. Utilizându-se tehnici microbiologice și tehnici moleculare, s-a demonstrat că mutanții represori pot fi selectați în acest scop. Caracterizarea genei represoare a fost făcută prin analiza secvențială a DNA și prin studii de legătură pentru determinarea puterii legăturii represorului.

În sumar, apoi prezenta descriere de invenție se referă la un sistem de selecție cuprinzând tulpinile bacteriene și plasmidele preferate și un protocol de selecție a substratului de sinucidere sensibil. Acest sistem de selectare poate fi utilizat pentru selectarea represorilor cu modificări specifice. Prezenta descriere de invenție cuprinde și prevederea exprimării genei de control în organismele respective prin represorii cu modificări specifice. Singura solicitare pentru această metodă de control a exprimării genei o reprezintă secvența de DNA a genei țintă, indentificarea "pseudo-operatorilor" fiind o secvență de DNA care seamănă cu secvența operatoare normală și un sistem de selecție care permite selectarea represorilor capabili de legare la acești "pseudo-operatori".

Exemplul 7. *III. Secvențele genei specifice ale florilor masculine*

Acest modul conține polinucleotidele arătate în fig. 17, 18 și 19 care sunt specific exprimate în țesutul florii masculine.

Plasmida pMS10 într-o tulpină de *Escherichia coli* R1 ca gazdă, conținând secvența genei arătată în figura 17, a fost depozitată la Colecția Națională de Bacterii Industriale și Marine la data de 9 ianuarie 1989 sub numărul de acces NCIB 40098.

Plasmida pMS14 într-o tulpină de *Escherichia coli* DH5α ca gazdă, conținând secvența genei de control arătată în fig. 18, a fost depozitată la Colecția Națională de Bacterii Industriale și Marine la data de 9 ianuarie 1989 sub numărul de acces NCIB 40099.

Plasmida pMS18 având ca gazdă o tulpină de *Escherichia coli* R1 conținând secvența genei de control arătată în fig. 19, a fost depozitată la Colecția Națională de Bacterii Industriale și Marine la data de 9 ianuarie 1989 sub numărul de acces NCIB 40100.

Izolarea și caracterizarea acestor secvențe de cDNA și utilizarea acestor secvențe de cDNA ca probe moleculare pentru identificare și pentru izolarea secvențelor genomice corespunzătoare, se va descrie în continuare.

Clonele care poartă secvențele genomice și prepararea unei casete promotoare dintr-una din clonele ilustrate mai sus, utilizează variante și tehnici care pot fi aplicate în mod egal la una din aceste clone. Mai mult decât atât, este descrisă prepararea unui promotor de fuziune pentru gena reporter și transformarea acestei construcții în speciile de testare.

În afară de cazul în care se specifică altfel, toate manipulările de acid nucleic sunt făcute prin procedee standard descrise în Sambrook, Fritsch și Maniatis Molecular Cloning: A Laboratory Manual Ediția a doua, 1989.

Exemplul 8. *1.Izolarea și caracterizarea cDNA specific florii masculine la porumb*

Pentru a clona molecule de cDNA în genele care sunt exprimate în florile masculine de porumb, s-au construit două colecții cDNA. La porumb, florile masculine sunt purtate de o inflorescență care termină tulpina principală. Colecția 1 este preparată din poli(A)RNA din întreaga inflorescență de porumb care poartă anterele meiotice timpurii (mai multe meiocite în profaza meiotică timpurie) și colecția 2 din poli(A)+RNA din întreaga inflorescență care poartă anterele meiotice târzii (predominant stadiile de diadă și tetradă timpurie). Fig. 14 reprezintă procedeul de selecție a colecției utilizate și care produce cinci molecule de cDNA

MFS meiotice timpurii unice și un cDNA meiotic târziu unic. Clona PMS3, un cDNA parțial cu 120 perechi de baze, izolat prin procedeul de selecție diferențială a fost utilizată ulterior ca o probă de hidridizare pentru izolarea clonei PMS18 corespunzătoare până la o lungime aproape completă.

Tabelul VII de mai jos însumează câteva caracteristici pentru fiecare din aceste clone de cDNA. Exprimarea moleculelor mRNA pentru cinci cDNA MFS izolate din colecția meiotică timpurie, este determinată în RNA izolat din ambele mostre de inflorescențe, timpurie și târzie. Moleculele mRNA care corespund la acești cDNA nu sunt complet specifice florilor masculine și sunt detectate la nivele considerabil scăzute în frunze (pMS10 și pMS18) sau în frunze, știuleți și rădăcini (pMS1, pMS2 și pMS4) așa cum este menționat în tabelul VII. În contrast cu pMS14, mRNA este găsit numai la RNA meiotic întârziat și nu este detectat în frunze, știuleți sau rădăcini.

Tabelul VII

	pMS1	pMS2	pMS4	pMS10	pMS14	pMS18
Colecția 1	1	1	1	1	2	1
Dimensiunea inserției 2	750	500	720	1350	620	940
Dimensiunea mRNA3	900	950	850	1600	900	1100
Specificitatea organului 4	+	+	+	++	+++	++
Exprimarea ferestrei 5	E/L	E/L	E/L	E/L	L	E/L

Tabel legendă

1. Izolate din colecția 1 cDNA (meiotic timpurie) sau din colecția 2 (meiotic întârziat).
2. Dimensiunea aproximativă în perechile de bază
3. Dimensiunea aproximativă în nucleotide
4. + = exprimată în inflorescență și la niveluri mult mai scăzută în frunze, știuleți și rădăcini.
   ++ = exprimat numai în inflorescență și la niveluri mult mai mici în frunze.
   +++ = exprimat numai în inflorescența.
5. E/L = mRNA prezent în RNA, atât din inflorescența meiotică timpurie, cât și din cea târzie.
   L = mRNA prezentă numai în RNA din inflorescența meiotică târzie.

S-a examinat exprimarea genelor corespunzătoare la aceste molecule de cDNA în timpul dezvoltării inflorescenței utilizându-se hibridizarea punctată (fig. 15). Această analiză punctată este generată prin legarea totală a RNA la nitroceluloză urmând hibridizarea la pMS a moleculelor de cDNA radiomarcate. Toate filtrele sunt expuse la filmare timp de 48 h, la o temperatură de -70°C, exceptând pMS10 care este expus timp de 168 h. Lungimea inflorescenței din fiecare probă, este astfel: A≥2 cm; B=2...5 cm; C=5...10 cm; D=10...15 cm; E=15...20 cm; F=20...30 cm și G=20...30 cm. Barele solide din fig. 15 arată stadiul de dezvoltare relativ la microsporogeneză în fiecare din probe: PM = premeioză; M = meioză; IP = polen imatur și MP = polen matur. Moleculele de mRNA meiotic timpuriu (pMS1, 2, 3, 10 și 18) acumulate foarte devreme în dezvoltarea inflorescenței o micșorează în acest caz cu 2 cm în lungime. Nu s-a analizat exprimarea meristemelor florare înainte de această fază.

Aceste molecule de mRNA persistă prin fazele de anteră meiotică și apoi sunt în declin în granulele de polen matur. În contrast, mRNA meiotic întârziat al pMS14 nu este detectat în inflorescență cu lungime mai mică de 5 cm, dar are loc o creștere dramatică la celulele sporogene ale anterei intrate în meioză (fig. 15). Ca și moleculele de mRNA meiotic timpuriu mRNA din pMA14 scade abrupt în polenul matur acumulat în antere (fig. 15).

Aceste date arată că, controale temporale diferite ale exprimării genelor se produc în timpul dezvoltării florilor masculine la porumb. Aceste controale ale

căror programe de acumulare pentru molecule de mRNA meiotice timpurii sunt probabil foarte similare, contrastează marcant cu cele de reglare aparentă și acumulare a mRNA meiotic târziu pMS14. Atât moleculele de mRNA meiotic, timpurii, cât și cele târzii sunt implicate în procesul de dezvoltare care se produce înainte de acumularea granulelor de polen matur. Este clar că acestea nu implică fazele târzii de dezvoltare a anterelor cum este dehiscența nici moleculele de mRNA care sunt acumulate în polenul matur.

Tehnica de hibridizare *in situ* a fost utilizată pentru determinarea localizării tisulare a MFs moleculelor de mRNA în florile masculine de porumb. Tehnica utilizată este descrisă în Wright și Greenland (1990; SEB Seminar Series, vol. 43 ed by N.Harris and D.Wilkman. Cambridge University Press, Vambridge; in press).

Datele prezentate se referă la mRNA al pMS14

Fig. 16 A, B arată hibridizarea *in situ* cu probele RNA antisens al pMS14. Probele de sens și antisens sunt preparate mult prin subclonarea fragmentului de pMS14 cu 300 perechi de baze în vectorul pBS, urmând prepararea transcriptorilor polimerazei T3 și T7 radiomarcați, utilizându-se metode sugerate prin furnizarea vectorului (Stratagene). Această hibridizare arată că mRNA al pMS14 este localizat în stratul celular tapetal din jurul microsporilor care se dezvoltă. Hibridizarea probei antisens pMS14 nu trebuie să se producă la orice alte celule din secțiune. În mod asemănător proba sens pMS14 nu trebuie să arate nici o hibridizare specifică (fig. 16C). Aceste secțiuni sunt făcute din inflorescențe de 15...20 cm în stadiul la care nivelul de mRNA al pMS1 este la maxim (fig. 15). În aceste secțiuni și în cele din experimentele ulterioare hibridizarea se produce până la tatetumul anterelor într-un panicul, dar nu și în altul. În figura 16 A, B straturile tapetate conțin mRNA al pMS14 în jurul microsporilor nu conțin mRNA al pMS14 în jurul celulelor sporogene care n-au fost supuse meiozei. Este o caracteristică a porumbului că, seturile de antere în paniculele individuale ale pivotului nu se dezvoltă co-ordinativ. Astfel, hibridizarea *in situ* arată că acumularea de mRNA al pMS14 este specifică țesutului și confirmă datele obținute din analiza punctată (fig. 15) această exprimare a mRNA al pMS14 fiind un stadiu specific, primul detectat în tapetumul din jurul celulelor meiotice.

Exemplul 9. *Determinarea secvenței DNA a pMS10*

DNA din clona cDNA, pMS10, pentru analiza secvenței prin subclonarea în M13mp18 utilizează procedee standard. Secvențele de nucleotide ale subclonelor sunt determinate prin metoda didcoxi utilizând procedee standard. În plus o secvență utilizează metode descrise de către furnizori. Regiunile clonelor sunt secvențializate prin inițiere cu oligonucleotidele sintetice sintetizate din secvența obținută din citirile prevăzute pe gel. Concentrațiile de oligonucleotide utilizate pentru priming sunt identice cu cele utilizate cu primerii universali. MFS clona pMS10 are lungimea completă a cDNA de 1353 perechi de baze. Secvența completă de nucleotide și secvența de aminoacizi corespunzătoare sunt arătate în fig. 17. Secvența conține o construcție cu citire deschisă a 1022 nucleotide codificând o polipeptidă de 341 amino-acizi cu o greutate moleculară dedusă de 37371 kd care este îmbogățită în reziduuri de glicină. Construcția cu citire deschisă este flancată de regiuni netranslate 5' și 3' cu 129 și respectiv 201 baze.

Exemplul 10. *Determinarea secvenței DNA a pMS14*

Procedeul de determinare a secvenței de nucleotide este descris în exemplul 9. Clona pMS114 este un cDNA cu secvență completă de nucleotide cu 581 perechi de baze, iar secvența de aminoacizi corespunzătoare este arătată în fig. 18. Secvența conține o construcție cu citire deschisă care se extinde de la nucleotida 1 până la nucleotida 278 codificând o polipeptidă parțială cu 127 amino-acizi.

Polipeptida este bogată, în special, în reziduuri de alanină și arginină. Construcția cu citire deschisă este flancată de o regiune necodificată 3' cu 203 nucle-

otide. Un proces de consens și un semnal de poliadenilare a hexanucleotidei, AATAAA se produce la poziția 548.

Exemplul 11. *Determinarea secvenței DNA a pMS18*

Procedeul pentru determinarea secvenței de nucleotide este la fel cu cel descris în exemplul 9.

Clona pMS18 este un cDNA de lungime aproape completă de 933 baze. Secvența de nucleotide completă și secvența de amino-acizi corespunzătoare este arătată în figura 19. La pMS18 lipsesc 28 de nucleotide la capătul 3'. Nucleotidele care lipsesc sunt prezente în clona pMJ3 care se suprapune secvenței pMS18 prin alte 91 de nucleotide. pMS3 este clona originală izolată prin selecția diferențială a cDNA inbranelor și este apoi utilizată ca probă de hibridizare la izolarea pMS18. PMS18 conține o construcție cu citire deschisă care se extinde de la nucleotida 151 până la nucleotida 813 și codifică o polipeptidă de 221 amino-acizi cu o greutate moleculară dedusă de 25 kilodaltoni. Polipeptida este bogată, în special,în reziduuri de arginină. Construcția cu citire deschisă este flancată de regiuni necodificate 5' și 3' cu 150 și respectiv 120 de nucleotide.

Exemplul 12. *Izolarea clonelor genomice corespunzătoare la pMS10*

Clonele genomice ale DNA care poartă genele corespunzând la cDNA, pMS10 au fost izolate din faza 3 EMBL a colecției de fragmente parțiale MboI al DNA din porumb. Colecția este selectată utilizându-se probele de radiomarcare "long-mar" sintetizate într-un sistem de marcare *in vitro*. Acest sistem cuprinde 50 mg dintr-o oligonucleotidă sintetică cu 100 de baze (poziția bazelor 452-551 la pMS10; fig. 17). Se utilizează 500 mg dintr-o oligonucleotidă primer sintetică, secvența TAGTTTCCT-CGGTAG și care va forma perechea de baze cu capătul 3' al oligonucleotidei lungi, una sau două oligonucleotide radiomarcate (de obicei, ^{32}PdCTP și/sau ^{32}P-dGTP) și 5...10 unități din fragmentul Klenow al DNA polimerazei 1. Reacțiile sunt efectuate la temperatura de 37°C, timp de 30 min într-un amestec tampon identic cu cel utilizat pentru metoda "inițiere-aleatoare" a DNA marcat cu excepția faptului că hexanucleotidele randomizate sunt omise. Faza compusă din cinci milioane de clone imobilizate pe filtre de nylon "Hybaid", se hibridizează la o temperatură de 65°C. cu aceste probe utilizându-se amestecuri tampon de pseudohibridizare și hibridizare sugerate de către furnizorii de filtrare (Amersham International). Filtrele sunt apoi spălate pe 3×SSC, 0,1% SDS la temperatura de 65°C utilizându-se aceste procedee au fost obținute 50...60 clone ale fagului EMBL3 conținând regiuni parțiale sau complete de gene pMS10. DNA din trei clone de fag EMBL3 10/CT8-1, 10/CT8-3 și 10/CT25-3 care combină complet genele pMS10 sunt preparate și analizate prin digestie cu enzime de restricție. Fiecare din aceste clone s-a arătat că, conține un fragment comun EcoRI de 9 kb care se extinde de la al treilea intron al genei pMS10 în porțiunea 5' necodificată și regiunile promotoare ale genei. Harta de restricție parțială a fragmentului de 9 kb EcoRI este prezentată în figura 20.

Exemplul 13. *Izolarea clonelor genomice corespunzătoare la pMS14*

Pentru izolarea clonelor genomice ale DNA care poartă genele corespunzătoare la cDNA, pMS14 se folosesc două moduri. În primul mod, metoda arătată în exemplul 12 este adoptată exceptând cele cinci milioane de clone ale fagului care sunt selectate cu o secvență completă de cDNA și din reziduurile epuizate după procedeul de hibridizare se produc două clone pozitive 14/CTA și 14/CTD. În cel de al doilea mod, fracțiunea tăiată de 12 kb EcoRI a DNA genomic evidențiată prin metoda Southern Blotting a fi purtătoarea genei pMS14, este legată la DNA al fagului EcoRI tăiat EMBL4 pentru a produce o colecție de fragmente de DNA de 17 kb clonate. Aproximativ 200000 de clone sunt selectate așa cum s-a descris mai înainte și au fost izolate două clone pozitive 14/17 m și 14/17 R care se combină la fragmentul EcoRI de 17 kb hibridizat la pMS14. Printr-o analiză ulterioară s-a determinat că două clone pozitive izolate din colecția parțială MboI/EMBL3 conțin un fragment intern de 17 kb. O hartă de

restricție parțială a acestui fragment EcoRI de 17 kb, comun tuturor clonelor, este arătată în fig. 21.

Exemplul 14. *Izolarea clonelor genomice corespunzătoare la pMS18*

Pentu a izola clonele genomice ale DNA care poartă genele corespunzătoare cDNA pMS18, este adoptat procedeul descris în exemplul 12. Cinci milioane de clone ale fagului EMBL3 se hibridizează într-o probă "long-mer" derivată din secvența pMS18, poziția 133-222. Secvența oligonucleotidei 3' complementare este 5'-GCCTCGGCGGTCGAC-3'. Două clone 18/CT3 și 18/CT23 care poartă gena pMS18 au fost izolate din această selecție. Harta de restricție a acestor clone arată că ambele conțin un fragment BamHI-SalI de 4,5 kb cuprinzând regiunea 5' a secvenței codificate a pMS18 și aproximativ 4 kb ale promotorului și regiunii ascendente a genei. O hartă de restricție parțială a clonei 18/CT3 este arătată în fig. 22.

Exemplul 15. *Construcția casetei promotoare derivată de la 10/CT8-3.*

Următoarele subclone sunt realizate din clona λEMBL3 10/CT8-3. Fragmentul PstI-EcoRI de 4,5 kb este clonat în pUC18 pentru a se obține pMS10-2. Fragmentul XbaI-EcoRI de 2,7 kb este clonat în pUC 18 pentru a se obține pMS10-1. Fragmentul HindIII până la XbaI de 1,6 kb este clonat în pUC18 pentru a se obține pMS10-4. Reacția în lanț a polimerazei (PCR) este utilizată pentru a amplifica un fragment de 930 bp din pMS10-3. Primerii utilizați pentru reacția PCR sunt următorii: primerul pUC/2 este omolog al secvenței pUC care flanchează porțiunea polilinker. Primerul 10/9 este complementar secvenței pMS10 din poziția 106-129 exceptând faptul că, conține un reziduu adițional de timidină între bazele 123 și 124. Secvența acestor primeri este următoarea:

pUC/2	5' CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT-3'
10/9	5'AGTCGGATCCCGCCCCGCGCAGCCG-3'

Conform amplificării în reacția PCR, se produce un fragment de DNA în care porțiunea flancată XbaI și secvența identică cu cea prezentă în regiunea corespunzătoare a clonei 10/CTB-3 până la baza imediat anterioară inițiatorului de translație, se reproduc complet cu excepția faptului că porțiunea nouă BamHI este introdusă prin introducerea unui reziduu de timidină. Acest fragment de 930 bp purificat prin gel și digerat cu XbaI și BamHI. El este apoi clonat în pMS10-4 care a fost în prealabil digerat cu XbaI și BamHI pentru a se produce clona pMS10-5. Secvențele pMS10-5 necesare pentru activitatea promotorului asociate cu gena MS10 reacționează și sunt modificate astfel ca promotorul să poată fi acum fuzionat la orice genă, prin porțiunea BamHI care se produce imediat înainte de punctul start de transație. Aceasta înseamnă că acestea și nu alte modificări produse au fost confirmate prin analiza secvenței.

Exemplul 16. *Construcția fuziunii promotoare între gena MS10 și gena reporter a glucuronidazei*

Fragmentul HindIII până la BamHI de 1830 bp din pMS10-5 (fig. 38) este legat la pTAK1, fiind tăiat în prealabil cu HindIII și AmaHI. PTAK1 este bazat pe un vector de transformare a plantei, binar Bin 19 menționat în Bevan, 1984; Nucleic Acide Research 12, 8711 și care poartă gena reporter a glucuronidazei (GUS) și terminatorul 3' (fig. 24). Plasmida rezultată denumită pMS10-6GUS și realizează o fuziune a genei de transcripție între promotorul genei MS10 și gena reporter GUS.

Exemplul 17. *Transformarea plantelor de tutun cu construcții genetice promotoare MS10*

Vectorul recombinat pMS10-6GUS așa cum este modificat din *Escherichia coli* (TG-2) în *Agrobacterium tumefaciens* (LBA 4404) într-o conjuncție triparentală pe

plăcile L cu *Escherichia coli* (HB101) adăpostește pBK2013. Transconjuganții sunt selectați pe un mediu minim conținând kanamicină (50 μg/cm^3) și streptomicină (500 μg/cm^3).

Amestecul L (5 cm^3) care conține kanamicină 50 g/cm^3, este inoculat cu o colonie simplă de *Agrobacterium*. Cultura este dezvoltată peste noapte la temperatura de 30°C, cu agitare la 150 rot/min. Această cultură (500 μl) este inoculată în amestecul L conținând kanamicină (50 μg/cm^3) și se dezvoltă ca mai înainte. Imediat înainte de utilizare *Agrobacteria* este transformată în pelete prin presare la 3000 rot/min timp de 5 min și suspendată într-un volum egal de mediu lichid de tip Muraschige și Skoog (MS).

Discurile de alimentare sunt preparate pe plăci petri de 9 cm diametru după cum urmează: Mediul solid MS suplimentat cu 6-benzil-aminopurină (6-BAP) (1mg/l) și acid 1-naftilenacetic (NAA) (o,1 mg/l) se însămânțează cu o cultură sub formă de suspensie (1 cm^3) de *Nicotiana tabacum* varietatea Samsun. Pe suprafața acestora se aduc discuri de hârtie de 9 cm și 7 cm.

Toate frunzele din cultura de țesuturi dezvoltă plante care sunt plasate pe plăcile de alimentare. Aceste plăci sunt închise cu "Niscofilm" și incubate peste noapte într-o cameră de dezvoltare a plantei (la temperatura de 26°C la lumină fluorescentă puternică).

Frunzele de pe discurile de alimentare sunt plasate în suspensia cu *Agrobacteria* pe discuri petri de 12 cm diametru și se taie în secțiuni de la 1 la 1,5 cm^2. După 20 min bucățile de frunze sunt aduse din nou pe discurile de alimentare care sunt închise și aduse în camera de dezvoltare. După 48 h de incubare în camera de dezvoltare, materialul din plantă este transferat în mediul MS suplimentat cu 6-BAP (1 mg/l) NAA (0,1 mg/l) carbenicilină (500 μg/cm^3) și kanamicină (100 μg/cm^3) pe discurile petri. Aceste discuri petri sunt apoi închise și readuse în camera de dezvoltare.

În primele trei săptămâni după inocularea cu *Agrobacterium*, tulpinile sunt îndepărtate din explante pe mediul MS suplimentat cu carbenicilină (200 μg/cm^3) și kanamicină (100 μg/cm^3) pentru dezvoltarea rădăcinilor.

Plantele sunt tranformate cu rădăcini de una până la două săptămâni după acest transfer. După apariția rădăcinilor, plantele transferate sunt transformate în vase care conțin pământ și se dezvoltă în seră. La aproximativ o lună după acest transfer, plantele înfloresc.

Anterele de plante, tutun, conținând construcția pMS10-6GUS sunt pulverizate pentru activite GUS, utilizându-se procedee standard.

Exemplul 18. *Gena proteinei dislocate*

Acest modul conține o genă expresibilă în plante, pentru inhibarea funcției mitocondriale și de aici exprimarea completă de dislocare a caracteristicii plantei selectate.

Conform acestor date, se propune o metodă de inhibare a exprimării genei într-un țesut al unei plante date cuprinzând transformări stabile a unui tip de celule din care planta întreagă poate fi regenerată cu construcția genetică care poartă țesutul specific sau promotorul specific de dezvoltare care operează în celulele din țesutul plantei date și o genă codificată proteina dislocată codificată care este capabilă, atunci când este exprimată, de inhibarea respiratorie în celulele din țesutul plantei date, ceea ce duce la moartea celulelor.

Gena de dislocuire preferată este selectată din:

(a) Proteina mamiferelor necuplată (UGT) clonată din țesutul adipos de mamifere brune (de obicei șobolani).

(b) O formă de mutație a genei pentru subunitatea β a FI-ATP-azei are secvențele adăugate sau eliminate astfel că, aceste schimbări au ca rezultat retenția abilității de asamblare cu alte subunități dar interferează cu funcția ca, de exemplu, a unei ATP-sintaze. Abilitatea acestor subunități alterate de a se asambla corect, va fi importantă în privința efectului fenotipic al exprimării lor dependent de competiția lor cu subunitățile de tip obișnuit

pentru legarea porțiunilor în complexul enzimatic. Astfel complecșii conținând subunități nefuncționale vor fi activi numai puțin și mitocondriile care adăpostesc acești complecși vor fi nefuncționale.

(c) O formă sintetică de mutație a genei *oli* 1 codifică subunitatea 9 a F-ATP azei. Mutațiile create sunt cele descrise mai sus la punctul (b).

(d) O formă de mutație a unei presecvențe mitocondriale de tranzit care funcționează prost în timpul trasnferului rezultat, probabil prin blocarea porțiunilor de receptori, în dislocarea transportului de proteine la mitocondrii.

(e) Construcția genetică cuprinzând o fuziune între gena subunității β din drojdie și gena β-galactozidazei din *Escherichia coli*, care rezultă în exprimarea unei proteine fuzionate de dislocare.

De preferință, promotorul este un promotor tapetum specific sau un promotor polen-specific, astfel că la exprimarea unei astfel de proteine dislocate în planta regenerată, partea masculină este sterilă. Mult mai preferabil este ca acest promotor taptum specific să aibă secvența arătată în fig. 17, 18 sau 19 ale desenelor însoțitoare.

Izolarea și caracterizarea acestor secvențe de control a acestor gene, conform prezentei descrieri de invenție, sunt descrise mai sus.

Acest modul, de aceea, se referă la o metodă de prevenire sau inhibare a dezvoltării și creșterii celulelor din plante bazate pe construcțiile genetice care inhibă funcția respiratorie. Tehnica are o largă aplicație într-un număr de culturi unde este necesară inhibarea, în special, a celulelor sau țesuturilor.

De un interes special este inhibarea fertilității masculine la porumb pentru producerea hibrizilor F1 *in situ*. Conceptul inhibării funcției mitocondriale ca mecanism pentru sterilitatea masculină apare din cercetările efectuate mai înainte în câteva cazuri privind sterilitatea masculină citoplasmatică de tip T la porumb (cms-T) care s-a arătat ca o asociere între fenotipul steril și disfuncția mitocondrială. Astfel, o relație directă cauzată este încă de stabilit între disfuncția mitocondrială și cmc-T, evidența corpului în creștere sugerează că funcția mitocondrială, în special, celulele tapetale, este esențială. Acest fapt este critic, în special, în timpul microsporogenezei deoarece solicitările metabolice plasate pe celulele tapetale rezultă în creșterea de 40 de ori a numărului de mitocondrii.

Astfel, se prevede numărul de mutații negative care acționează asupra mitocondriilor pentru o fosforilare oxidativă necuplată. Când în anterele de porumb există o exprimare specifică în țesuturi, aceste mutații rezultă din fenotipul masculin steril.

Proteina de dislocare propusă, UCP este funcțională în termogeneza țesutului adipos de mamifere brune și există ca dimer în membrana internă mitocondrială formând un canal de protoni și astfel are loc fosforilarea oxidativă necuplată prin disiparea diferențelor potențial electrochimice ale protonilor care străbat membrana.

O alternativă este utilizarea construcțiilor genetice himerice în acest domeniu fiind schimbate, create proteine nefuncționale. Proteinele studiate aici sunt β subunități ale F1-ATPazei și subunitatea 9 a Fo-ATPazei. În timpul asamblării funcționale a complecșilor ATPazei, subunitățile himerice modificate vor completa porțiunile normale de legătură ocupate de subunitățile produse pe cale naturală, în special, când himerele sunt comparate ca supra-exprimate cu genele endogene. Funcția mitocondrială va fi dislocată deoarece F1-ATP-aza și Fo-ATPaza reunite cu subunitățile modificate sunt aparente a fi ușor active sau nefuncționale.

Metoda utilizată pentru trasnformarea celulelor din plante nu este specială în această invenție și poate fi utilizată deci orice metodă convenabilă pentru plantele respective. Plantele transgenice sunt obținute prin regenerarea celulelor transformate. Numeroase procedee de transformare cunoscute în literatura de specialitate, ca, de exemplu, agroinfecția utilizând *Agrobacterium tumefaciens* sau plasmida T1, prin electroporare, microinjectarea celulelor din plante și protoplaștilor, transformări cu micropro

iectile și trasnformarea tubului de polen, acestea fiind doar câteva din procedeele menționate. Pot fi făcute referiri la literatura de specialitate pentru detalii complete în ceea ce privește metodele cunsocute.

Dezvoltarea și testarea acestor construcții genetice ca înlocuitori ai funcției mitocondriale în organismul celular, în drojdii, se vor descrie în cele ce urmează. Un mecanism prin care aceste construcții pot fi utilizate pentru inhibarea dezvoltării celulelor de plante și pentru diferențierea în plantele trasnformate, va fi, de asemenea, descrise în continuare. Obiectul acestor procedee este acela al utilizării ca sistem model pentru identificarea și optimizarea construcțiilor genetice pentru exprimarea proteinelor care înlocuiesc funcția mitocondrială. Celulele din plante vor fi apoi trasnformate cu construcții selectate și plante total regenerate din acestea.

O realizare specifică pentru acest modul va fi ilustrată prin următorul exemplu.

Exemplul 19. Se cunoaște din literatura de specialitate că gena de șobolan UGP inserată în vectorul navetă de drojdie/*Escherichia coli*, duce la obținerea numai a unor niveluri scăzute de UCP. Drojdia este specia de *Saccharomyces cerecisiae* YM147 și gena UCP este convenabilă pentru plasmida pCGS110-UCP.

S-au menționat lipsa unor niveluri de exprimare uzuale din gene de tip sălbatic, modificarea genelor de șobolani UCP utilizându-se mutageneza directă pe porțiunea studiată. Sunt făcute următoarele modificări:

1. Introducerea în porțiunea BamHI a șapte nucleotide 5' la codonul de inițiere al metioninei AUG;

2. Modificarea secvenței în jurul codonului de inițiere a metioninei AUG pentru a se conforma secvenței consens din drojdie ATAATG;

3. Eliminarea porțiunii interne BamHI și

4. Introducerea în porțiunea BamHI a unei nucleotide 3' la codonul terminației TAG.

Aceste modificări rezultă în eliminarea secvențelor UCP netranslatate 5' și 3' de șobolan, ca și introducerea unei secvențe consens la drojdie în codonul de inițiere a metioninei.

Fragmentul EcoRI de 1,9kb din plasmida pCGS110-UCP (o hartă a plasmidei este prezentată în fig. 26 și secvența mRNA a genei UCP este prezentată în fig. 27), care poartă regiunea promotoare GAL 10 și UCP cDNA la șobolan este clonată în porțiunile EcoRI/PstI ale M13 mp19 DNA. Secvențializarea cosntrucțiilor rezultate este efectuată pentru a asigura o structură corectă.

Mutageneza direcționată pe aceste porțiuni este efectuată conform instrucțiunilor date de Amersham în trusa mutagenezei utilizându-se trei diferite ologinucleotide, după cum urmează:

UCP-1 tip sălbatic	CTCTGCCCTCCGAGCCAAGATGGTGAGTT
mutant	CTCTGCCCTCGGATCC (ATAATG) GTGAGTT
UCP-2 tip sălbatic	TGCGACTCGGATCCTGAACG
mutant	TGCGACTCGGTTCCTGAACG
UCP-3 tip sălbatic	ACCACATAGGCGACTTGGAG
mutant	ACCACATAGGATCCGACTTGGAG

Oligonucleotidele UCP-1 este utilizată pentru introducerea secvenței consens din drojdie (circulară) care se produce în jurul codonului de inițiere a metioninei, ca și pentru introducerea porțiunilor de clivaj BamHI (porțiunile subliniate).

Oligonucleotida UCP-2 este utilizată pentru eliminarea porțiunii interne BamHI (porțiunile subliniate).

Oligonucleotida UCP-3 este utilizată pentru introducerea porțiunii BamHI imediat după codonul stop TAG (subliniat).

Aceste trei mutații permit izolarea întregii secvențe codificate UCP pe fragmentul BamHI de 0,93 kb.

După selecția clonelor mutante DNA

este digerat cu BamHI. Trei clone din cele douzeci selectate dau inserțiile de 0,93 kb după digestia cu BamHI.

Secvențializarea clonelor UCPS1 și UCBS4 arată că gena UCP a fost modificată corect, nici o modificate neașteptată nefiind prezentă. Gena UCP este apoi transferată la plasmida de exprimare la drojdie pKV49 care permite exprimarea genelor străine în *Saccharomyces cerevisiae* sub controlul unui promotor puternic PGK și Gal1-10UAS permite introducerea/represia unei gene străine conform prezenței sau absenței galactozei în mediul de dezvoltare. Fragmentul BamHI de 0,93 kb conținând gene UCP modificată este clonat în porțiunea de restricție pKV49 la BglII, rezultând în construcția pKV49-UCP.

Transformarea drojdiei cu construcția pKV49-UCP. a) *Dezvoltarea unei tulpini convenabile de drojdie*

Pentru un recipient pentru construcția pKV49-yUCP este necesară o tulpină de drojdie care poartă markerii corespunzători pentru transformarea și inducția expresiei genetice din GAL1-10UAS care este incapabilă de a utiliza galactoza ca sursă de carbon și de energie (GAL1, GAL2). Astfel de tulpini sunt generate prin încrucișarea tulpinilor de drojdie YM147 și SF747. După selecția diplozilor pe plăci minime conținând uracil, coloniile sunt transformate în medii de sporulare. Sporii care rezultă sunt dezvoltați pe plăci YDP înainte ca coloniile de drojdie rezultate să fie caracterizate (fig. 28). Două tulpini noi de drojdie BET9 (ura3, trp11, leu2, has3, gal1) și BE27 (ura3, trp1, leu2, gal1) sunt izolate, ambele fiind convenabile pentru transformarea cu contracțiile pe bază de pKV49.

b) *Transformarea drojdiei*

Tulpinile de drojdie BET9 și BE27 sunt transformate cu pKV9 și pKV49-UCP; trasnformanții sunt selectați utilizându-se selecția auxotrofică potrivită (leu) și controlul prin izolarea plasmidelor urmând realizarea hărții de restricție. Coloniile simple din fiecare din cei patru transformanți diferiți BET9/pKV49, BET9/pKV49-UCP, BE27/pKV49 și BE27/pKV49-UCP sunt resuspendate în apă sterilă înainte de apariția spoturilor pe mediile de pe plăcile conținând o varietate de surse de carbon (fig. 29), ambele în prezența sau în absența galactozei. Rezultatele obținute din aceste teste pe discuri (fig. 29), indică faptul că, pe câteva din sursele de carbon utilizate, prezența galactozei și a construcției pKV49-UCP rezultă din dezvoltarea slabă a coloniilor de drojdie rezultate. Un efect mai mare asupra retardării dezvoltării, s-a observat cu mediul format din glicerol și casamino (gly/cas) conținând galactoză pentru ambii transformați pKV49-UCP. Transformanții, fie cei la care lipsește gena UCP, fie cei induși prin dezvoltarea în mediu de galactoză se dezvoltă în același grad ca și speciile BET9 și BE27 netransformate.

Analiza curbei de dezvoltare

Așa cum prin testele efectuate pe plăci s-a indicat o slabă dezvoltare a transformanților pKV49 pe mediu de glicerol și casamino în prezența galactozei, analiza curbei de dezvoltare în cultura lichidă este efectuată pentru a determina cu multă acuratețe magnitudinea defectului de dezvoltare. Rezultatele din fig. 30 substituie rezultatele testelor de pe plăci și indică faptul că nici prezența PKV49-UCP DNA și nici numai prezența galactozei nu este suficientă pentru a obține vreun efect asupra gradului de dezvoltare a celulelor de drojdie, în timp ce prezența acestor două substanțe întârzie sever dezvoltarea. Conform rezultatelor obținute inițial prin utilizarea tulpinii de drojdie YM147 transformată cu construcția pCGS110-UCP nu s-a arătat nici un defect semnificativ în dezvoltarea pe sursele de carbon testate în prezența galactozei, ceea ce ar duce la părerea că modificarea genei UCP și/sau utilizarea unui vector diferit (pKV49) are ca rezultat un defect observabil al dezvoltării.

Analiza expresiei UCP

Deoarece analiza curbei de dezvoltare nu a indicat o diferență detectabilă între transformanții BE27 și BET9 (fig. 30), s-a decis să se utilizeze numai transformanți BET9 în experimentele ulterioare. Repetând analiza dezvoltării pe un mediu gly/cas, atât în prezența, cât

și în absența galactozei cu transformanți BET9, culturile au fost lăsate să se dezvolte timp de 47 h, pentru ca aceeași curbă de dezvoltare a caracteristicilor observată mai înainte (fig. 31), să fie repetată. Celulele sunt apoi recoltate, iar totalul de proteine este izolat și fracționat (în duplicat) prin SDS-PAGE pe gel de poliacrilamidă de 10%. Un set de proteine fracționate sunt colorate cu albastru Coomassie pentru a asigura o încărcare egală a proteinelor în timp ce alt set este transferat pe membrana de nylon și supus analizei Western prin stopare utilizându-se anticorpi de șobolani UCP. Analiza Western prin stopare arată două caracteristici principale.

1) Nivelul comparativ al exprimării UCP între transformanții BET9/pKV49-UCP și VY147/pCH110-UCP demonstrează că exprimarea UCP a crescut de aproxiamtiv 50...100 de ori ca o consecință a modificărilor arătate.

2) Transformantul din drojdie care arată o dezvoltare defectivă când se dezvoltă pe mediu gly/cas în prezența galactozei exprimă așadar substanțiale cantități de UCP.

Din aceste rezultate se poate ajunge la concluzia că, modificarea genei UCP și/sau a clonei secundare în vectorul pKV49 are ca rezultat creșterea nivelului de exprimare relativă a UCP la nivelele detectate inițial cu construcția pCGS110.

Analiza curbei de dezvoltare arată că exprimarea UCP are un efect asupra gradelor de dezvoltare la drojdie la celulele dezvoltate în anumite condiții. Până acum nu s-a putut identifica efectul specific al creșterii nivelelor de exprimare ale UCP în gradul de dezvoltare a celulelor de drojdie, dar rezultatele preliminare implică un defect mitocondrial. Analiza curbei de dezvoltare efectuată în mediu de rafinoză (o sursă de carbon fermentabilă care n-ar putea afecta reglarea de Gal) a transformanților BET9 dezvoltați în prezența sau în absența galactozei arată că prezența ambelor gene UCP și a galactozei nu au nici un efect asupra gradului de dezvoltare (fig. 32). Analiza Western prin spotare a proteinelor izolate din celulele cultivate în timpul formării acestor curbe de dezvoltare arată nivele de exprimare similară a UCP cu cele găsite în celulele de dezvoltare pe mediu gly/cas în prezența galactozei.

UCP detectat în transformanții BET9/pKV49-UCP dezvoltați fără adaos de galactoză se datorește probabil reziduurile de galactoză eliberate în mediu prin hidroliza rafinozei, posibil în timpul autoclivajului. Aceste observații arată că prezența UCP în celulele de drojdie dezvoltate pe o sursă fermentabilă de carbon (nu este necesară fosforilarea oxidativă) nu are vreun efect asupra gradului de dezvoltare celulară, în timp ce celulele care se dezvoltă pe mediul format din gly/cas (o sursă nefermentabilă de carbon) exprimate prin UCP, arată o dezvoltare defectuoasă.

Localizarea UCP în celulele din drojdie

UCP la șobolan este un component major al membranei interioare mitocondriale a țesutului adipos brun. Spre deosebire de multe alte polipeptide găsite în membrana interioară, aceasta nu conține semnal clivabilă, informațiile necesare fiind codificate intern în secvența de amino acizi a proteinei. După cum indică rezultatele exprimarea UCP are un efect asupra gradului, de dezvoltare a celulelor din drojdie, ceea ce este important pentru determinarea precisă a localizării proteinei exprimată în celulele de drojdie. Analiza inițială Western prin spotare a proteinelor totale mitocondriale arată UCP exprimat prin transformantul pKV49 care trebuie localizat în fracțiunea mitocondrială.

Ulterior, fracționarea mitocondrială arată că majoritatea UCP se loclizează în fracțiunea membranei interioare a mitocondrilor de drojdie. Așadar, câțiva dintre acești UCP par a fi localizați în spațiul interior al membrilor, această observație fiind datorată contaminării acestei fracțiuni cu câteva din fracțiunile membranei interioare. În mod similar au fost obținute rezultate cu localizarea β-subunităților din complexul F1-ATPasei din celulele mitocondriale de drojdie. Subunitatea-β care este un component al acestei membrane interioare este așadar detectată în preparatele intermembranale. Cu toate acestea, aceste rezultate arată că informarea respectivă referitoare la UCP

la șobolan este suficientă pentru a aduce UCP la membrana interioară a mitocondriilor de drojdie unde ar putea funcționa un deconectant de proteină.

Analiza transcriptorilor UCP

RNA au fost izolat din multe din experimentele curbei de dezvoltare descrise mai înainte. S-a efectuat în mod curent analiza Northern prin spotare în vederea determinării faptului că exprimarea de origine a UCP se reflectă prin semnalele de transcripție UCP.

Efectul unui număr de reproduceri asupra exprimării UCP

Transformarea celulelor de drojdie cu vectorii navetă conținând originea replicației din cercul de 2 μm din drojdie, ca, de exemplu, pKV49-UCP, rezultă în aceste plasmide, fiind prezente la un nivel de aproxiamtiv 40...50 de reproduceri per celulă. În consecință, orice genă străină purtată de plasmidă va fi prezentă la aproxiamtiv același nivel ca număr de reproduceri care rezultă în exprimarea proteinelor străine la un nivel ridicat, față de cel văzut pentru gena prezentă în cazul unui număr mic de reproduceri. De aceea se intenționează să se micșoreze numărul de reproduceri al genei UCP prin integrarea acesteia în cromozomul de drojdie într-o singură parte rezultând un transformant într-o singură reproducere, genetic stabilă. Vectorul Yip5 (fig. 33) este un vector de integrare din drojdie care poartă gena URA 3; aceasta este incapabilă de a se replica autonom în drojdie.

Fragmentul EcoRI/SalI de 1,8 kb din pKV49-UCP conținând gena UCP de șobolan împreună cu promotorul PKG și GAL UAS clonat în porțiunile Yip5 DNA și EcoRI-SALI. Plasmida rezultată UIP-UCP (fig. 33) este controlată prin harta de restricție enzimatică pentru a verifica dacă gena UCP a fost corect inserată. Plasmida YIP-UCP este tăiată cu enzima de restricție EcoRV (care taie în mijlocul genei URA3) și apoi DNA linearizat YIP/UCP este utilizat pentru transformarea liniilor celulare din drojdie BET9 și BE27. Transformanții sunt inițial selectați pe plăci minimale prin selectarea pentru prototrofia uracilului și după 7...10 zile, doi transformanți din fiecare linie celulară sunt trecuți pe plăci YPD (neselective). Transformanții sunt apoi supuși pentru patru perioade consecutive la dezvoltare pe un mediu neselectiv. O sută de colonii din fiecare din cei patru transformanți originali sunt apoi replicați pe plăci cu medii neselective (YDP) și medii selective (plante minimale + ura). Toate coloniile dezvoltate pe mediile selective arată că gena URA3 care este genetic lipită de gena UCP (fig. 33), a fost integrată în cromozomul celular din drojdie. DNA cromozomal este izolat din fiecare din cei patru transformanți, apoi este digerat cu enzima de restricție EcoRI și fracționat pe un gel de agaroză 0,08%. Analiza Southern prin spotare utilizând proba UCP marcată, arată că gena UCP este prezentă în cromozomul de drojdie la toți cei patru trasformanți. Analiza Western prin spotare utilizând anticorp de șobolan UCP va arăta nivelul de exprimare la acești transformanți. Analiza curbei de dezvoltare a acestor transformanți dezvoltați în prezența galactozei arată că aceștia pot avea o inhibare a dezvoltării, consistentă cu un efect mitocondrial.

Exemplul 20. *Modificarea subunității β a F1-ATP-azei*

O a doua cale pentru introducerea mutațiilor afectând funcția mitocoadrială este o modificare directă a funcțiilor mitocondriale din proteine care, atunci când sunt exprimate în drojdie, se pot aștepta la o interferență cu generația ATP. Proteina aleasă pentru acest procedeu este subunitatea β a complexului F1-ATP-azei. Secvența de DNA a genei subunității β din drojdie este cunoscută și gena a fost indepedent clonată și secvențializată.

Porțiunea de F1-ATP-ază a ATP sintazei catalitează faza terminală a fosforilării oxidativă F1 și care este un ansamblu de cinci polipeptide diferite desemnate ca α, β, γ, δ și ϵ. Experimentele efectuate de către Parsonage și al. privind modificarea subunității β a F1-ATP-azei din *Escherichia coli*, au identificat reziduurile de amino-acizi specifice ale subunității β care par a fi foarte importante pentru cataliza, atât a sintezei ATP, cât și pentru hidroliză. Două mutații, în special, sunt arătate a fi rezultatul catalizei mult defectuoase fără

să cauzeze perturbarea structurală majoră a F1-ATPazei. Una din aceste mutații rezultă din schimbarea reziduului de lizină puternic conservat care se produce în mediul catalitic de legare a nucleotidei din poziția 155 cu reziduul de glutamină, în timp ce altă mutație rezultă din schimbarea reziduului de metionină din poziția 209 cu reziduul de leucină. Ambele aceste mutații au fost puse să exercite efectul lor prin prevenirea schimbărilor confirmaționale necesare din cooperativitatea catalitică în complexul F1.

Deoarece asamblarea acestor proteine ale subunității β mutante în F1-ATPaza nu este afectată, s-a considerat că mutante similare ale subunității β din drojdie pot fi competitive pentru unirea cu F1-ATP-aza. S-a crezut că rezultatul având ambele tipuri de mutante, de tip obișnuit și mutante ale subunităților β în aceeași F1-ATP-ază ar rezulta poate din cataliza defectuoasă, care rezultă din descreșterea producției de ATP și retardarea dezvoltării celulare.

Subunitatea β F1-ATPazei dintr-o mare varietate de surse, a arătat a fi superior conservată în secvența de amino-acizi și comparația subunităților β ale secvenței de amino-acizi din *Saccharomices cerevisiae*, cu cele din *Escherichia coli*, confirmă că lizina și metionina sub formă de reziduuri arătate de către Parsonage și al. ar fi foarte importante pentru activitatea catalitică care se poate conserva cu reziduurile de lizină și metionină produse la pozițiile 196 și 255, respectiv pe secvența subunității β din drojdie.

În vederea efectuării SDM, gena subunității β de tip sălbatic din drojdie este izolată din plasmida PGR208 (fig. 34) ca fragment EcoRI/BamHI care este clonat în M13mp19. Sunt construite două gene mutante ale subunității β: mutanta BB1 are și Met255 și Lys196 convertite la izoleucină și, respectiv, glutamină în timp ce mutanta BB2 are doar lizina transformată în glutamină.

Urmând analiza secvenței pentru a asigura o mutageneză corectă cu nici o mutație nedorită, genele subunității β cu mutații sunt îndepărtate din mp19 prin digestia cu EcoRI/BamHI. Fragmentele conținând genele sunt apoi tocite la capăt și legate la BglII digerat pKV49 (fig. 35) care a avut înainte capetele tocite. Au fost clonate ambele gene cu mutații ale subunității β în pKV49 (pKV49-BB1 și pKV49-BB2) și s-a transformat tulpina de drojdie BET9 cu ambele aceste construcții. Curba de dezvoltare și dezvoltarea pe plăci pentru ambii transformanți ai subunității β arată că transformanții au caracteristicile de dezvoltare schimbate și care sunt consistent cu un defect mitocondrial.

În concurență cu transformarea tulpinei BET9 cu genele mutante ale subunității β gena de dislocare poate fi utilizată pentru construirea unui derivat al speciei BET9 care nu va corespunde sintetizării subunității β. Tulpina rezultată de aceea va fi incapabilă de a se dezvolta pe sursă de carbon nefermentabile și deci va fi ușor de menținut pe o sursă de carbon fermentabilă cum ar fi, de exemplu, glucoza. Transformarea acestei tulpini cu plasmide care poartă gene mutante ale subunității β urmând măsurarea caracteristicilor de dezvoltare a transformanților pe o sursă de carbon nefermentabilă, arată că subunitatea β modificată este incapabilă de a suporta o fosforilare oxidativă.

Exemplul 21. *Fuziunea proteinelor*

O strategie alternativă pentru perturbarea selectivă a funcției mitocondriale este exprimarea proteinei fuzionate care rezultă, fie în celulele slab dezvoltate, fie celule deloc dezvoltate, din drojdie. Proteina de fuziune care candidează, aleasă din acest proiect, conține regiunea N-terminală din subunitatea β a ATP-sintazei din drojdie care fuzionează la majoritatea β-galactozidazelor din *Escherichia coli* și au fost construite prin fuziune genetică (fig. 36). Această proteină de fuziune subunitate β/galactozidază β a fost deja arătată a fi dirijată la membrana internă a mitocondriilor din drojdie 921 și celulele care exprimă această fuziune a proteinei par a fi incapabile de a se dezvolta pe o sursă de carbon nefermentabilă. În prezența proteinei de fuziune, capacitatea de transducție a membranei mitocondriale așa cum a fost măsurată prin reacția de schimb ^{32}P-ATP, este numai

de 9% din cea măsurată în absența proteinei de fuziune. Deoarece până în prezent mecanismul acestei descrieri n-a fost evaluat, se crede că fuziunea genei este astfel realizată ca să producă o proteină care începe să devină propagată în membrana internă și să interfereze cu funcția esențială pentru dezvoltarea respirației.

Construcția genei fuzionate ATP2/LacZ

Plasmida pGR208, care conține gena subunității β ATP codificată de ATP2 DNA din drojdie (fig. 34) este digerată cu EcoRI plus BamHI rezultând eliberarea fragmentului de 1,1kb codificând pentru primii 350 de amino-acizi ai proteinei subunității β. pMUR1720 este o plasmidă de bază pUCB care conține gena LacZ conținută în fragmentul EcoRI/NarI (fig. 36). Clonând fragmentul de 1,1 kb EcoRI/BamHI DNA codificând pentru primii 350 amino-acizi ai proteinei subunității β din drojdie în porțiunile EcoRI/BamHI ale pMUR1720 (fig. 36) rezultă o fuziune interioară între 350 amino acizi ai subunității β și proteina întreagă LacZ (minus primii opt amino-acizi) (fig. 36). Fuziunea genei subunității întreagă LacZ este acum astfel încât să conțină fragmentul de 4,3 kb EcoRI/NarI în construcția pMUR1720-BLZ (fig. 36). Acest fragment de 4,3 kb EcoRI/NarI este curent clonat în vectorul pKV49 rezultând construcția pKV49-BLZ (fig. 37) care poate fi utilizat pentru transformarea tulpinii de drojdie BET9 și BE27 și care arată că inducția prin dezvoltarea pe galactoză determină un defect consistent prin creșterea inhibării mitocondriale.

Exemplul 22. *Construcția fuziunii de promotor între gena MS10 și gena UCP*

1830 bp HindIII la fragmentul BamHI din pMS10 este legat într-un vector de transformare a plantei binare Bin9 în prealabil fragmentat cu HindIII și BamHI.

Urmând ligarea plasmidei rezultate, aceasta este secvențializată cu BamHI și legată la fragmentul de 930 bp UCP BamHI din plasmida pUC/UCP care este derivată din pUC19 conținând gena modificată UCP clonată la porțiunea BamHI, pentru a construi fuziunea între gena promotoare MS10 și gena UCP. În final capătul 3' al fragmentului obținut de 250 bp SstI-EcoRI din vectorul pTAK1 este legat al construcția MS10-UCP secvențializată în prealabil cu SstI și EcoRI.

Plasmida rezultată este denumită pBin/MS10-UCP (fig. 39) și conține promotorul MS10, gena UCP, caseta de exprimare cu capătul 3' localizat între secvențele de margine din dreapta și stânga ale T-DNA din *Agrobacterium* permițând o transformare eficientă în celulele de tutun.

Exemplul 23. *Transformarea plantelor de tutun cu construcția genei promotoare pBin/MS10*

Vectorul recombinat pBin/MS10-UCP este mobilizat din *Escherichia coli* (TG-2) pe *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404) într-o încrucișare triparentală pe plăcile L cu *Escherichia coli* (HB101) care adăpostește pRK2013. Transconjugațiile plantelor de tutun sunt selectați pe un mediu minimal conținând kanamicină (50 µg) și streptomicină (500 µg).

Amestecul L (5 cm^3) conținând kenamicină 50 g/cm^3 se inoculează cu o singură colonie de *Agrobacterium*. Cultura este dezvoltată peste noapte la temperatura de 30°C, cu agitare la 150 rot/min. Această cultură (500 µg) este inoculată în amestecul L care conține kanamicina (50 µg) și se dezvoltă apoi ca mai sus. Imediat înainte de utilizarea *Agrobacteriei* amestecul este granulat prin filare la 3000 rot/min timp de 5 min și apoi se suspendă într-un volum egal de mediu lichid Murashige și Skoog (MS).

Plăcile de alimentare sunt preparate pe discuri petri cu 9 cm diametru, după cum urmează. Mediul solid MS suplimentat cu 6-benzil-amino purina (6-BAP) (1 mg/l) și acid 1-naftalenacetic (NAA) (0,1 mg/l) este suprapus cu *Nicotiana tabacum* varietatea Samsun în cultură sub formă de suspensie (1 cm^3). Pe suprafața discurilor sunt plasate hârtii de filtru de 9 și 7 cm diametru.

Frunzele întregi din cultura de țesuturi din plantele dezvoltate sunt plasate pe discurile de alimentare. Plăcile sunt închise cu "Nescofilm" și incubate peste noapte într-o cameră de dezvoltare a

plantelor la temperatura de 26°C sub lumină strălucitoare fluorescentă.

Frunzele de pe plăcile de alimentare sunt plasate într-o suspensie de *Agrobacteria* pe discuri petri de 12 cm diametru și apoi se taie în secțiuni de 1...1,5 cm^2. După 20 min bucățile de frunze sunt aduse din nou pe discurile de alimentare care sunt apoi închise și readuse în camera de dezvoltare a plantelor. După 48 h de incubare în camera de dezvoltare a plantelor materialul din plante este apoi transferat pe mediul MS suplimentat cu 6-BAP (1 mg/l), NAA (0,1 mg/l), carbenicilină (500 $\mu g/cm^3$) și kanamicină (100 µg) pe discuri petri, iar aceste discuri petri sunt închise și readuse în camera de dezvoltare a plantelor.

După primele trei săptămâni de la inoculare cu *Agrobacterium*, lăstarii sunt îndepărtați din explante și plasate pe mediul MS suplimentat cu carbenicilină (200 $\mu g/cm^3$) și kanamicină (100 $\mu g/cm^3$) pentru dezvoltarea rădăcinilor.

Plantele transformate prind rădăcini după una până la două săptămâni de la transfer. După dezvoltarea rădăcinilor, plantele transformate sunt trasnferate în vase care conțin sol și se dezvoltă în seră. La aproxiamtiv o lună după transfer, plantele înfloresc.

Anterele plantelor de tutun conținând construcția pBin/MS10-UCP, se analizează în ceea ce privește exprimarea genei UCP prin analiza Northern a petelor pe mostrele de RNA și efectul exprimării UCP este determinat pe polenul dezvoltat.

Revendicări

1. Construcție genetică care determină sterilitate masculină la plante, **caracterizată prin aceea că**, cuprinde o genă ce codifică o proteină capabilă să disloce biogeneza polenului viabil și gena de reglare care include o secvență promotor introductibilă prin aplicarea externă a unui inductor chimic la planta care conține construcția.

2. Construcție genetică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, gena de reglare include o secvență operatoare de control a genei de dislocuire și a genei represoare care codifică o proteină represoare adaptată la interacțiunea cu gena operatoare de dislocuire și inhibă expresia proteinei dislocuite, gena proteinei represoare fiind reglată pritr-un promotor inductibil chimic.

3. Construcție genetică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, secvența promotor este specifică florii masculine fiind operativ unită la gena proteinei de dislocuire, pentru restricția expresiei genei de dislocuire în porțiunea cu flori masculine a plantei.

4. Construcție genetică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, cuprinde: (a) o secvență promotor a primei gene responsabilă de prezența sau absența inductorului chimic exogen, (b) gena care codifică proteina represoare sub controlul primei secvențe promotoare menționată mai sus, (c) o secvență operatoare responsabilă de proteina represoare menționată mai sus, exprimată prin gena proteinei represoare, (d) o secvență promotoare a genei specifice florii masculine expresibilă numai pentru părțile masculine ale plantei și (e) o genă care condifică proteina de dislocuire capabilă să disloce biogeneza polenului vitabil, în care prezența sau absența inductorului chimic exogen în plantă permite selecția fertilității sau sterilității masculine.

5. Construcție genetică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, secvența promotor a genei inductibilă chimic este o subunitate de 27 kg izolată din gena glutation-S-transfazei (GST II) la porumb.

6. Construcție genetică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, inductorul pentru gena promotor este N,N-dialil-2,2-diclor-acetamida sau benzil-2-clor-4-(trifluormetil)-5-tiazol-carboxilatul.

7. Construcție genetică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, inductorul este N,N-dialil-2,2,-diclor-acetamida.

8. Construcție genetică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, gena de dislocuire este gena proteinei necuplată la mamifere (UCP).

VERSIUNE CORECTATĂ - CORRECTED VERSION
Semnalat în: / Reffered to in: BOPI 12/1998

plantelor la temperatura de 26°C sub lumină strălucitoare fluorescentă.

Frunzele de pe plăcile de alimentare sunt plasate într-o suspensie de *Agrobacteria* pe discuri petri de 12 cm diametru și apoi se taie în secțiuni de 1...1,5 cm^2. După 20 min bucățile de frunze sunt aduse din nou pe discurile de alimentare care sunt apoi închise și readuse în camera de dezvoltare a plantelor. După 48 h de incubare în camera de dezvoltare a plantelor materialul din plante este apoi transferat pe mediul MS suplimentat cu 6-BAP (1 mg/l), NAA (0,1 mg/l), carbenicilină (500 $\mu g/cm^3$) și kanamicină (100 µg) pe discuri petri, iar aceste discuri petri sunt închise și readuse în camera de dezvoltare a plantelor.

După primele trei săptămâni de la inoculare cu *Agrobacterium*, lăstarii sunt îndepărtați din explante și plasate pe mediul MS suplimentat cu carbenicilină (200 $\mu g/cm^3$) și kanamicină (100 $\mu g/cm^3$) pentru dezvoltarea rădăcinilor.

Plantele transformate prin rădăcini după una până la două săptămâni de la transfer. După dezvoltarea rădăcinilor, plantele transformate sunt trasnferate în vase care conțin sol și se dezvoltă în seră. La aproxiamtiv o lună după transfer, plantele înfloresc.

Anterele plantelor de tutun conținând construcția pBin/MS10-UCP, se analizează în ceea ce privește exprimarea genei UCP prin analiza Northern a petelor pe mostrele de RNA și efectul exprimării UCP este determinat pe polenul dezvoltat.

Revendicări

1. Construcție genetică care determină sterilitate masculină la plante, **caracterizată prin aceea că**, cuprinde o genă ce codifică o proteină capabilă să disloce biogeneza polenului viabil și gena de reglare care include o secvență promotor introductibilă prin aplicarea externă a unui inductor chimic la planta care conține construcția.

2. Construcție genetică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, gena de reglare include o secvență operatoare de control a genei de dislocuire și a genei represoare care codifică o proteină represoare adaptată la interacțiunea cu gena operatoare de dislocuire și inhibă expresia proteinei dislocuite, gena proteinei represoare fiind reglată pritr-un promotor inductibil chimic.

3. Construcție genetică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, secvența promotor este specifică florii masculine fiind operativ unită la gena proteinei de dislocuire, pentru restricția expresiei genei de dislocuire în porțiunea cu flori masculine a plantei.

4. Construcție genetică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, cuprinde: (a) o secvență promotor a primei gene responsabilă de prezența sau absența inductorului chimic exogen, (b) gena care codifică proteina represoare sub controlul primei secvențe promotoare menționată mai sus, (c) o secvență operatoare responsabilă de proteina represoare menționată mai sus, exprimată prin gena proteinei represoare, (d) o secvență promotoare a genei specifice florii masculine expresibilă numai pentru părțile masculine ale plantei și (e) o genă care condifică proteina de dislocuire capabilă să disloce biogeneza polenului vitabil, în care prezența sau absența inductorului chimic exogen în plantă permite selecția fertilității sau sterilității masculine.

5. Construcție genetică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, secvența promotor a genei inductibilă chimic este o subunitate de 27 kg izolată din gena glutation-S-transferazei (GST II) la porumb.

6. Construcție genetică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, inductorul pentru gena promotor este N,N-dialil-2,2-diclor-acetamida sau benzil-2-clor-4-(trifluormetil)-5-tiazol-carboxilatul.

7. Construcție genetică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, inductorul este N,N-dialil-2,2,-diclor-acetamida.

8. Construcție genetică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, gena de dislocuire este gena proteinei necuplată la mamifere (UCP).

VERSIUNE CORECTATĂ - CORRECTED VERSION
Semnalat în: / Reffered to in: BOPI 12/1998

9. Construcție genetică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, gena de dislocuire este o mutație a genei pentru subunitatea beta a F1-ATP-azei care are secvențe adăugate sau eliminate, astfel ca aceste schimbări să aibă ca rezultat retenția abilității de asamblare cu alte subunități, dar care interferează cu funcția, cum ar fi o ATP sintaza.

10. Construcție genetică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, gena de dislocuire este sub formă sintetică, de mutație a genei *oli* 1, codificând subunitatea 9 a Fo-ATP-azei.

11. Construcție genetică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, gena de dislocuire este o mutație a presecvenței tranzit mitocondriale care funcționează în timpul transferului în așa fel, încât rezultă dislocarea proteinei de transport la mitocondrii.

12. Construcție genetică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, gena de dislocuire este o construcție genetică care poartă o fuziune între gena subunității *beta* din drojdie și gena *beta*-galactozidazei din *Escherichia coli*, ceea ce are ca rezultat exprimarea proteinei de fuziune dislocuită.

13. Construcție genetică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, gena represoare este gena proteinei de legătură cu DNA adusă sub controlul promotorului inductil chimic gena proteinei de legătură cu DNA codificată fiind capabilă de interacțiune cu secvența operatoare asociată cu gena de dislocuire.

14. Construcție genetică, conform revendicării 13, **caracterizată prin aceea că**, gena proteinei legată de DNA codifică o proteină represoare, astfel că, prin exprimarea genei proteinei legată de DNA, exprimarea proteinei prin gena de dislocuire este inhibată.

15. Construcție genetică, conform revendicărilor 12 sau 13, **caracterizată prin aceea că**, atât gena proteinei legată de DNA, cât și gena operatoare nu au originea în plante.

16. Construcție genetică, conform revendicării 15, **caracterizată prin aceea că**, atât gena proteinei legată de DNA, cât și gena operatoare sunt de origine bacteriană.

17. Construcție genetică, conform revendicării 16, **caracterizată prin aceea că**, atât gena proteinei legată de DNA, cât și gena operatoare sunt derivate din gena lacI din *Escherichia coli*.

18. Construcție genetică, conform revendicării 7, **caracterizată prin aceea că** represorul și operatorul sunt izolați din plasmida desemnată p35SlacI, conținută în *Escherichia coli* tulpina TG-2 depozitată la Colecția Națională de la Industrial an Marine Bacteria Limited, Aberdeen Marea Britanie la 12 decembrie 1988 sub numărul de acces NCIB 40092.

19. Construcție genetică, conform revendicării 2, **caracterizată prin aceea că**, gena operatoare de dislocuire este o secvență pseudo-operatoare și gena represoare este o genă de reglare mutantă care codifică represorul având o secvență de amino-acizi care se leagă la pseudo-operator.

20. Construcție genetică, conform revendicării 3, **caracterizată prin aceea că**, secvența specifică florii masculine este polinucleotida arătată în fig. 15.

21. Construcție genetică, conform revendicării 20, **caracterizată prin aceea că**, secvența specifică florii masculine este izolată din plasmida p35SlacI, conținută în *Escherichia coli* tulpina R1 depozitată la Colecția Națională de Bacterii Industriale și Marine la 9 ianuarie 1989 sub numărul de acces NCIB 40090.

22. Construcție genetică, conform revendicării 21, **caracterizată prin aceea că**, flora specifică masculină și gena de dislocuire sunt desemnate din plasmida pBin/MS10-UCP având structura menționată în fig. 39.

23. Construcție genetică, conform revendicării 3, **caracterizată prin aceea că**, secvența specifică florii masculine cuprinde polinucleotida arătată în fig. 16 sau o variantă a acesteia permisă prin degenerarea codului genetic.

24. Construcție genetică, conform revendicării 23, **caracterizată prin aceea că**, secvența specifică florii masculine este

izolată din plasmida pMS14, conținută în *Escherichia coli* tulpina DH 5 *alfa* depozitată la Colecția Națională de Bacterii Industriale și Marine la 9 ianuarie 1989 sub numărul de acees NCIB 40090.

25. Construcție genetică, conform revendicării 3, **caracterizată prin aceea că**, secvența specifică florii masculine cuprinde polinucleotida arătată în fig. 17.

26. Construcție genetică, conform revendicării 25, **caracterizată prin aceea că**, secvența specifică florii masculine este izolată din plasmida pMS18, conținută în *Escherichia coli* tulpina R1 depozitată la Colecția Națională de Bacterii Industriale și Marine la 9 ianuarie 1989 sub numărul de acces NCIB 40100.

27. Construcție genetică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, este încorporată în genomul propriu al unei plante transformate restaurabilă din punct de vedere al sterilității masculine sau porțiuni de plantă.cum ar fi celule, protoplaști și semințe.

28. Construcție genetică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, este încorporată în genomul propriu al unei plante dicotiledonate sau monocotiledonate.

Președintele comisiei de examinare: **farm. Pentelescu Elena**
Examinator: **biochim. Crețu Adina**

VERSIUNE CORECTATĂ - CORRECTED VERSION
Semnalat în: / Reffered to in: BOPI 12/1998

9. Construcție genetică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, gena de dislocuire este o mutație a genei pentru subunitatea beta a F1-ATP-azei care are secvențe adăugate sau eliminate, astfel ca aceste schimbări să aibă ca rezultat retenția abilității de asamblare cu alte subunități, dar care interferează cu funcția, cum ar fi o ATP sintaza.

10. Construcție genetică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, gena de dislocuire este sub formă cintetică, de mutație a genei *oli* 1, codificând subunitatea 9 a Fo-ATP-azei.

11. Construcție genetică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, gena de dislocuire este o mutație a presecvenței tranzit mitocondriale care funcționează în timpul transferului în așa fel, încât rezultă dislocarea proteinei de transport la mitocondrii.

12. Construcție genetică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, gena de dislocuire este o construcție genetică care poartă o fuziune între gena subunității *beta* din drojdie și gena *beta*-galactozidazei din *Escherichia coli*, ceea ce are ca rezultat exprimarea proteinei de fuziune dislocuită.

13. Construcție genetică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, gena represoare este gena proteinei de legătură cu DNA adusă sub controlul promotorului inductil chimic gena proteinei de legătură cu DNA codificată fiind capabilă de interacțiune cu secvența operatoare asociată cu gena de dislocuire.

14. Construcție genetică, conform revendicării 13, **caracterizată prin aceea că**, gena proteinei legată de DNA codifică o proteină represoare, astfel că, prin exprimarea genei proteinei legată de DNA, exprimarea proteinei prin gena de dislocuire este inhibată.

15. Construcție genetică, conform revendicărilor 12 sau 13, **caracterizată prin aceea că**, atât gena proteinei legată de DNA, cât și gena operatoare nu au originea în plante.

16. Construcție genetică, conform revendicării 15, **caracterizată prin aceea că**, atât gena proteinei legată de DNA, cât și gena operatoare sunt de origine bacteriană.

17. Construcție genetică, conform revendicării 16, **caracterizată prin aceea că**, atât gena proteinei legată de DNA, cât și gena operatoare sunt derivate din gena lacI din *Escherichia coli*.

18. Construcție genetică, conform revendicării 7, **caracterizată prin aceea că** represorul și operatorul sunt izolați din plasmida desemnată p35SlacI, conținută în *Escherichia coli* tulpina TG-2 depozitată la Colecția Națională de la Industrial an Marine Bacteria Limited, Aberdeen Marea Britanie la 12 decembrie 1988 sub numărul de acces NCIB 40092.

19. Construcție genetică, conform revendicării 2, **caracterizată prin aceea că**, gena operatoare de dislocuire este o secvență pseudo-operatoare și gena represoare este o genă de reglare mutantă care codifică represorul având o secvență de amino-acizi care se leagă la pseudo-operator.

20. Construcție genetică, conform revendicării 3, **caracterizată prin aceea că**, secvența specifică florii masculine este polinucleotida arătată în fig. 15.

21. Construcție genetică, conform revendicării 20, **caracterizată prin aceea că**, secvența specifică florii masculine este izolată din plasmida p35SlacI, conținută în *Escherichia coli* tulpina R1 depozitată la Colecția Națională de Bacterii Industriale și Marine la 9 ianuarie 1989 sub numărul de acces NCIB 40090.

22. Construcție genetică, conform revendicării 21, **caracterizată prin aceea că**, flora specifică masculină și gena de dislocuire sunt desemnate din plasmida pBin/MS10-UCP având structura menționată în fig. 39.

23. Construcție genetică, conform revendicării 3, **caracterizată prin aceea că**, secvența specifică florii masculine cuprinde polinucleotida arătată în fig. 16 sau o variantă a acesteia permisă prin degenerarea codului genetic.

24. Construcție genetică, conform revendicării 23, **caracterizată prin aceea că**, secvența specifică florii masculine este

izolată din plasmida pMS14, conținută în *Escherichia coli* tulpina DH 5 *alfa* depozitată la Colecția Națională de Bacterii Industriale și Marine la 9 ianuarie 1989 sub numărul de acees NCIM 40090.

25. Construcție genetică, conform revendicării 3, **caracterizată prin aceea că**, secvența specifică florii masculine cuprinde polinucleotida arătată în fig. 17.

26. Construcție genetică, conform revendicării 25, **caracterizată prin aceea că**, secvența specifică florii masculine este izolată din plasmida pMS18, conținută în *Escherichia coli* tulpina R1 depozitată la Colecția Națională de Bacterii Industriale și Marine la 9 ianuarie 1989 sub numărul de acces NCIB 40100.

27. Construcție genetică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, este încorporată în genomul propriu al unei plante transformate restaurabilă din punct de vedere al sterilității masculine sau porțiuni de plantă cum ar fi celule, protoplaști și semințe.

28. Construcție genetică, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, este încorporată în genomul propriu al unei plante dicotiledonate sau monocotiledonate.

Președintele comisiei de examinare: **farm. Pentelescu Elena**
Examinator: **biochim. Crețu Adina**

(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

STERILITATE MASCULINĂ RESTAURABILĂ

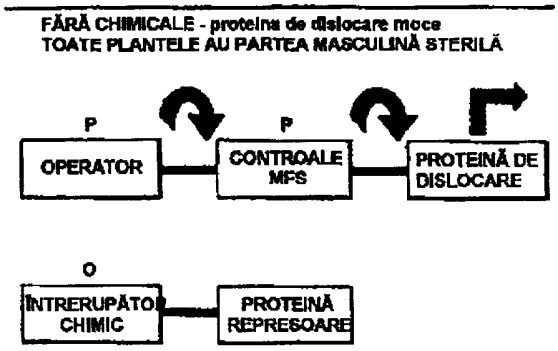


Fig. 1

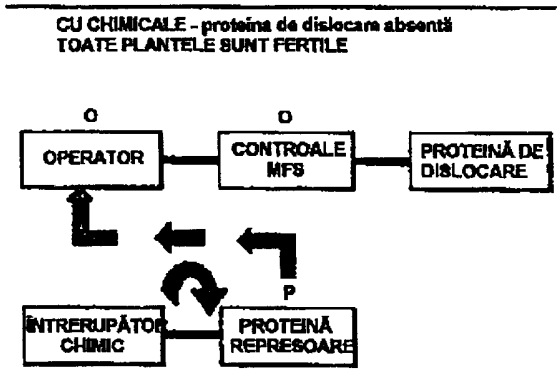


Fig. 2

(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

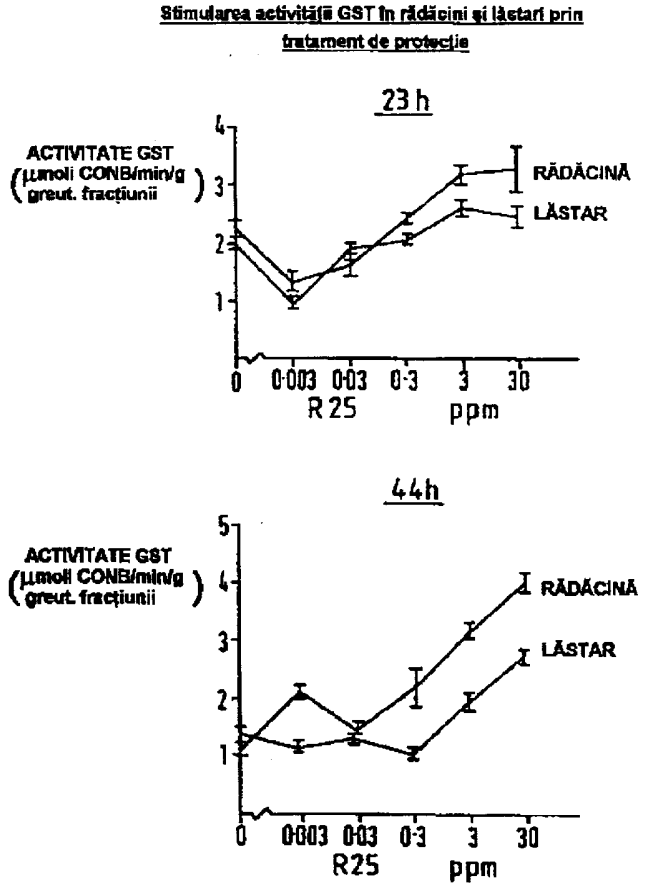


Fig. 3

(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

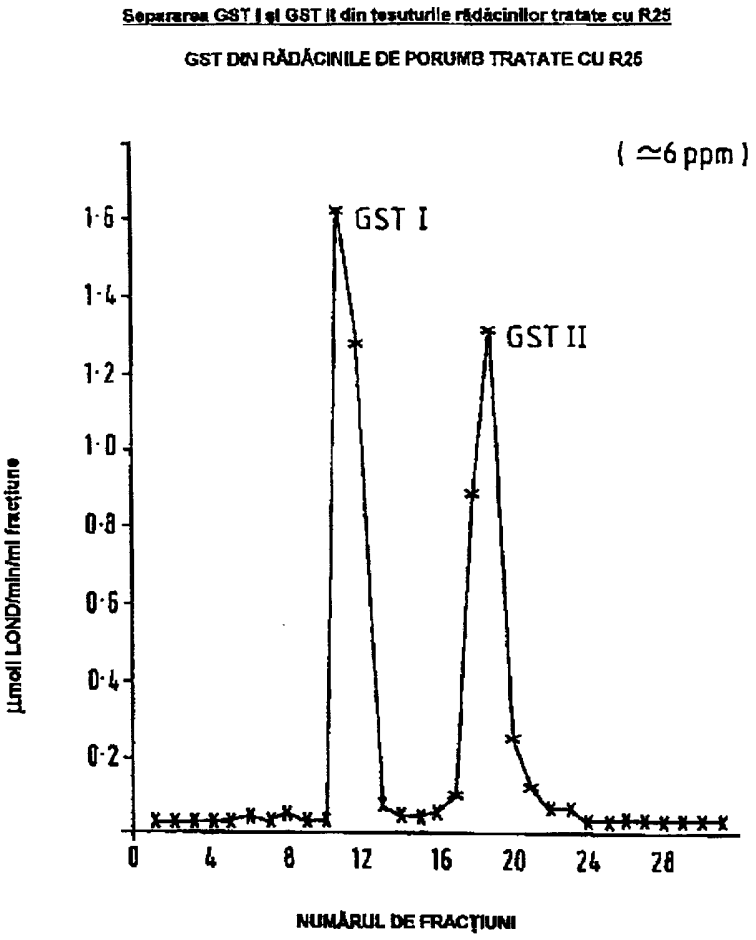


Fig. 4

(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

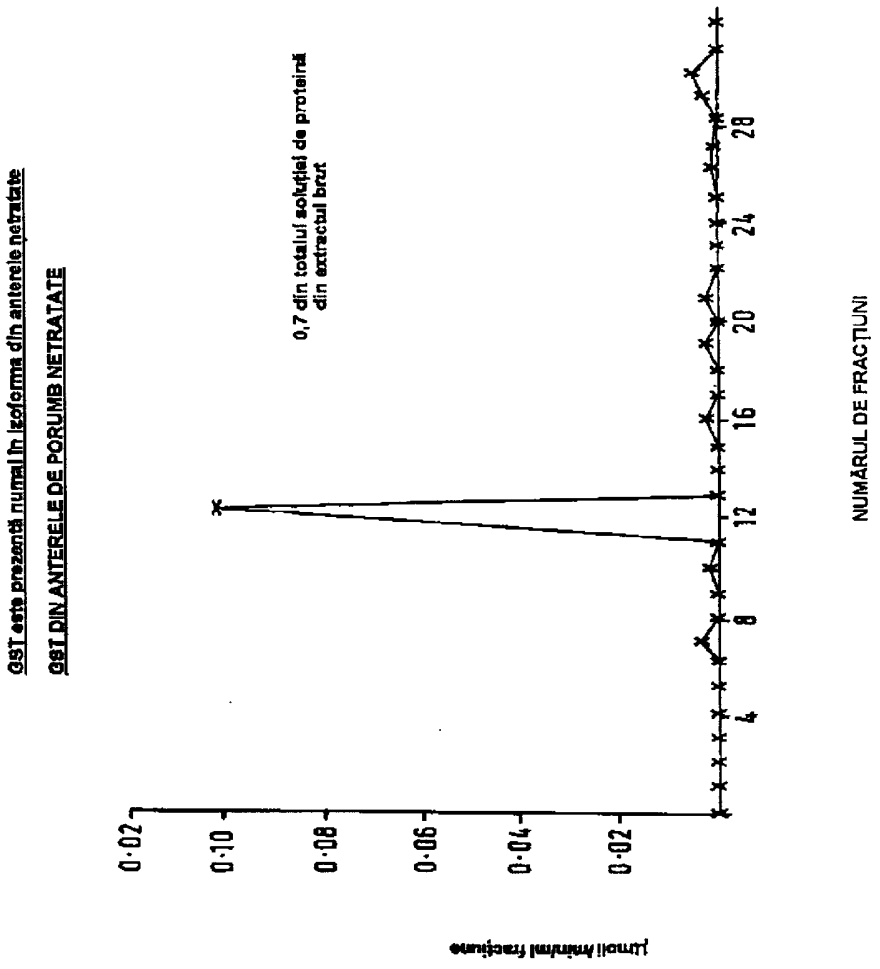


Fig. 5

(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

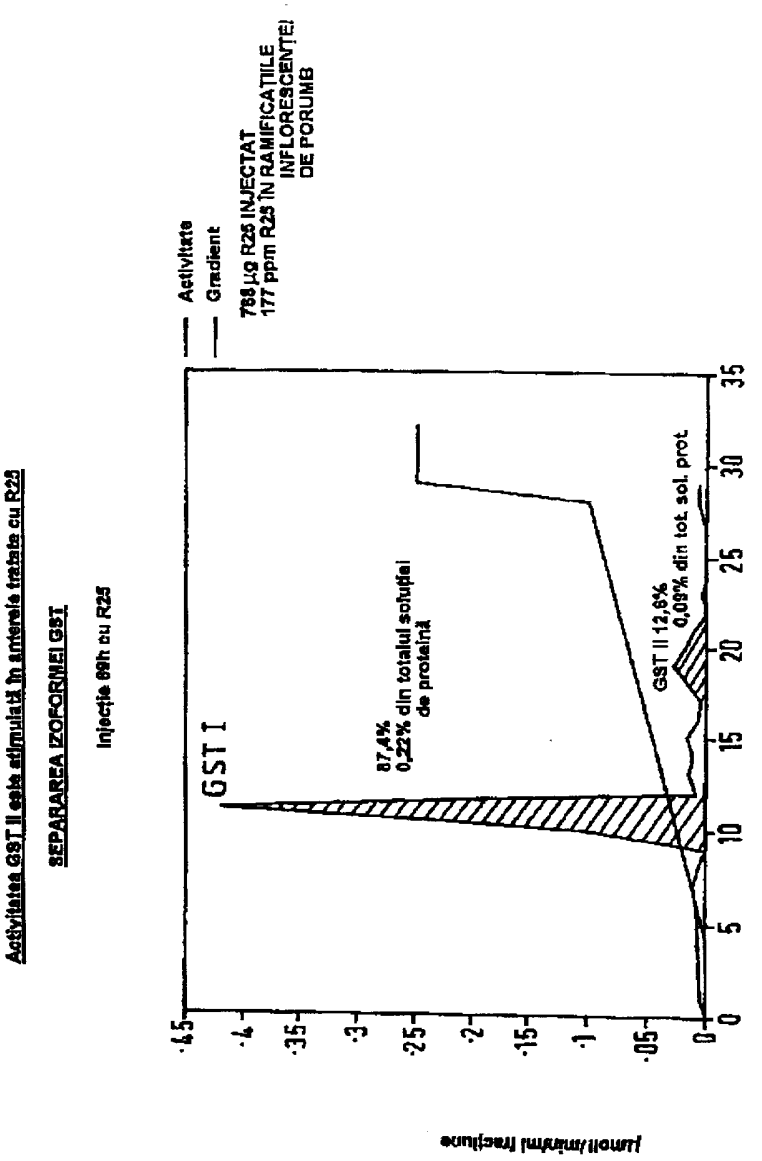


Fig. 6

(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

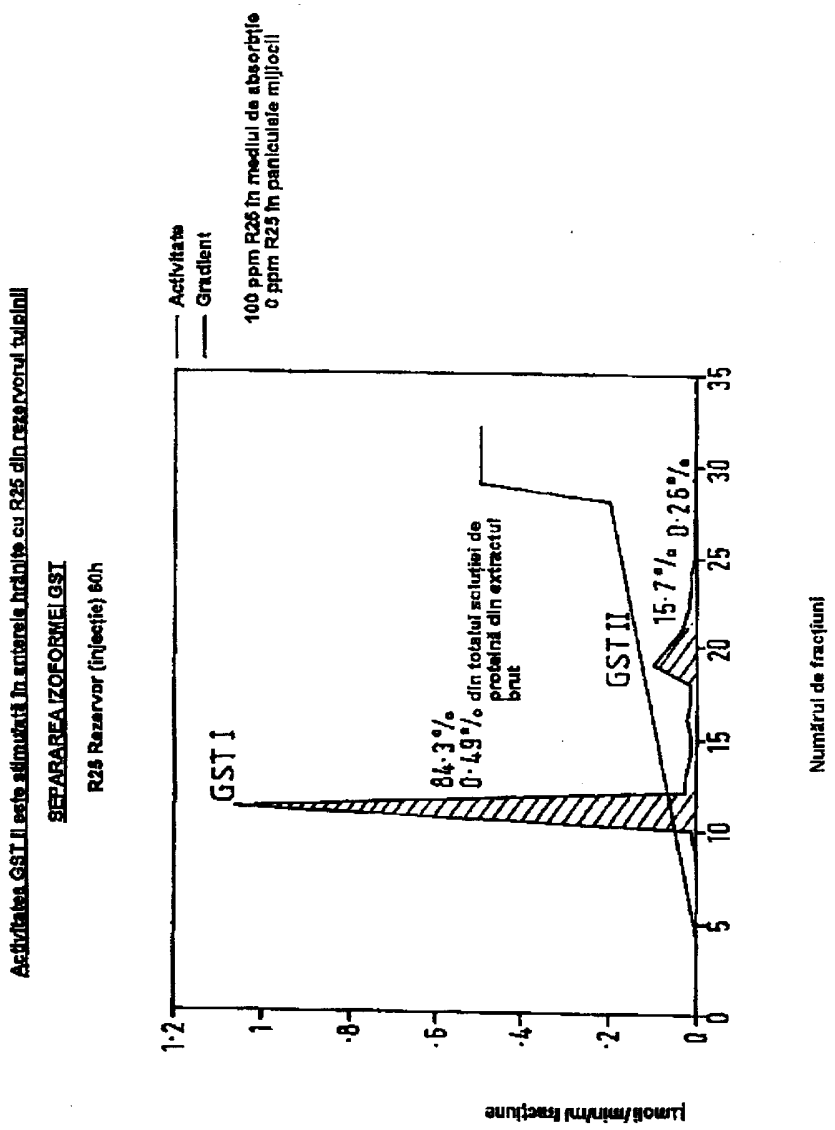


Fig. 7

(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

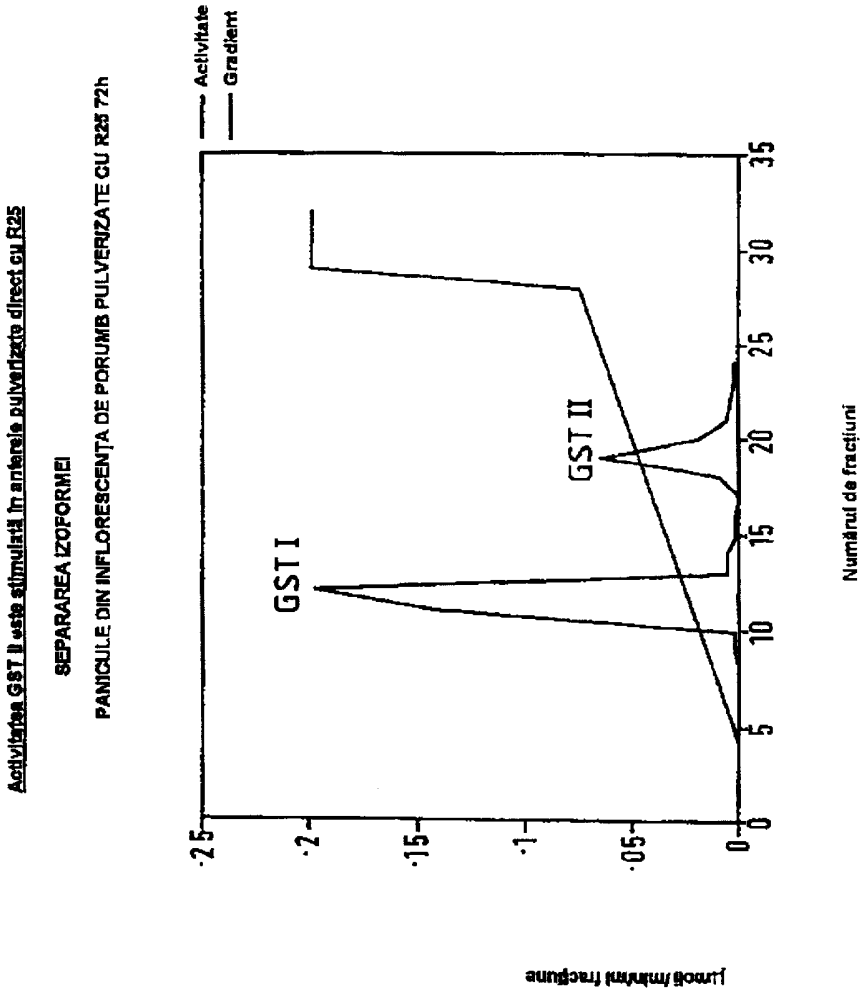


Fig. 8

(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

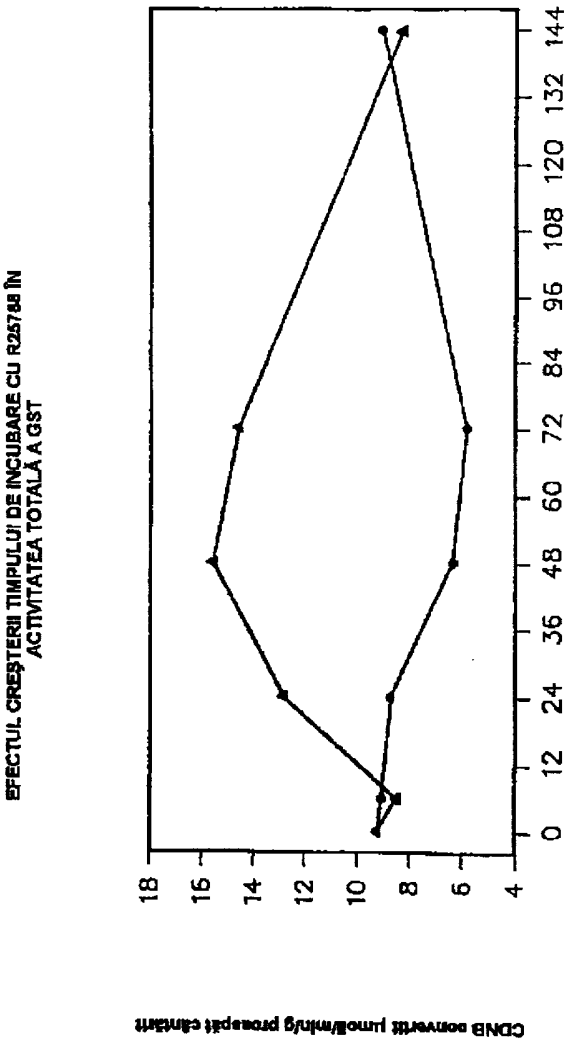


Fig. 9

(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

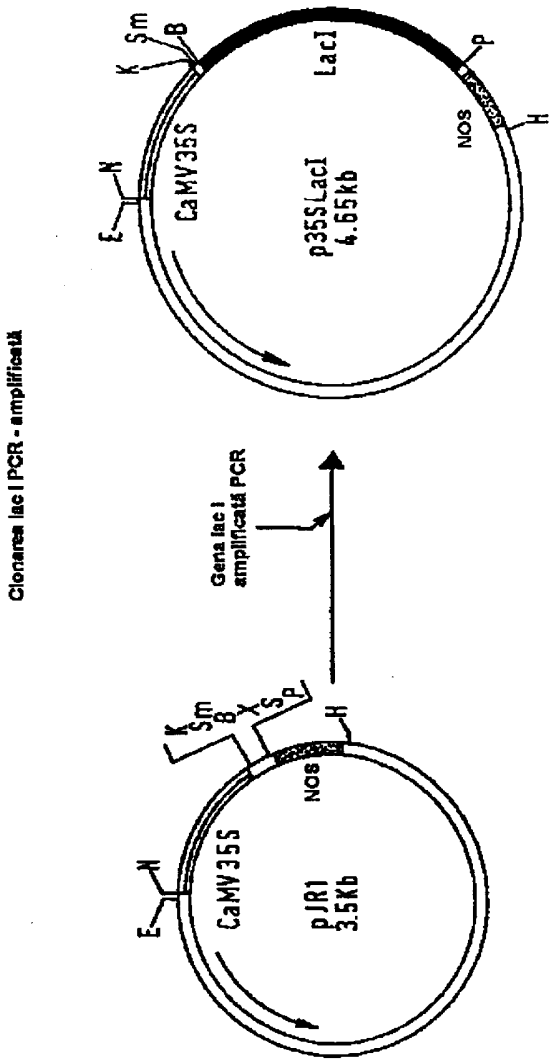


Fig. 10

(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

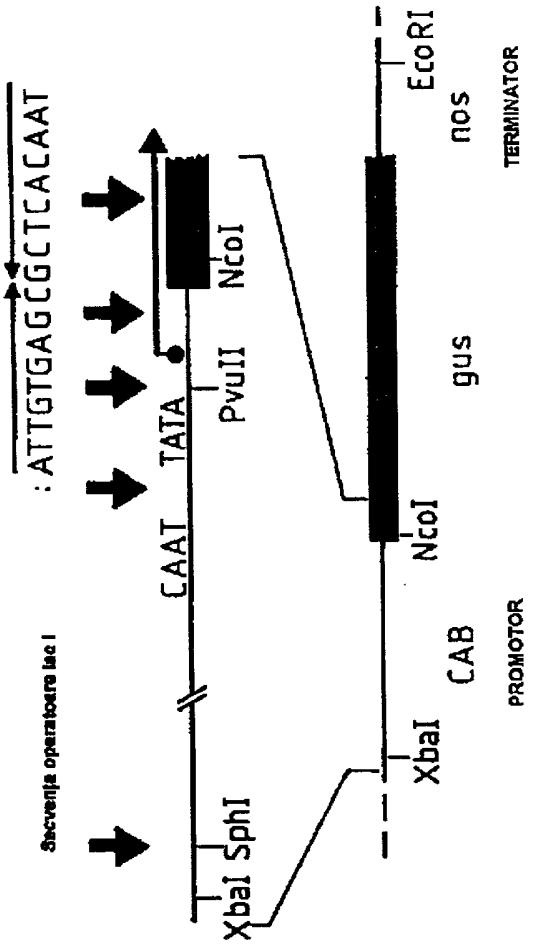


Fig. 11

(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

Secvența fragmentului promotor CAB XbaI - NcoI

```
          10         20         30         40         50
    XbaI  :          :          :          :          :
  1 GTCTAGATATGTTTCTCTTTTGGTTCTTGAGTTGACAAGTGGCATGCTAT
 51 TTTTGCTCATGTGAGAAAAAATATAGCACCGTTTGTTTCGTTGAAATTGA
101 ATTGCATCCCAATAATCATAATTTAGACATAAACCAACTAAGTTAATATA
151 TTTGTATATGTAAATATGTTATCCTAAATTATAATTATATGAGAGAGATA
201 GTTATACATTACAATTATGATATAGAGAAGCAAATAGAAGAGTGTGCTAT
251 AAGTTGTACATTGTAAAAGTAGTATGCAAATTTATAGAATTAATTTTTAT
301 CTTTCACCTCATAAATTTAAGATACACTTATATATAAACTTTGAAAAGTT
351 GTAAAATATCATATTCTAAAAAAAAATAGACTATTCTATTAGTTAGATTCC
401 AATTCCTTAAAATAAAAGAAAATAAATGGGCTTAAGGGCTAGTTTGGTGG
451 GCAGGTGGAGGCGATCAATGGCGGATGAATCCTCTCGATATTCAATTGAG
501 GGGGTTCATCCCATGAATCTCTCTATTTACATGTCCACCAAACAAGATTA
551 AATGCAATGATACATAGCTTTTGTGCATATTTTTTTTTAACGGAGATGCA
601 AAACAGTATACAAGATGTGTGTATGTTCCCATGCGACCCATCTTGTATCC
651 AGTTCATGCGTCTGGTGGTTGAACCAGAAAGATACACATGATCCATTTCG
701 ATGAATCAACACAAAAGACTTCATTGATTATGCATTTGACAAATAGCAAG
751 AAGCGGCGGGGCAACAAAGCCCATCCTATCTCATCCATTTTTTCCCACGAT
801 GGCAAGTGGCAGCTCCTGATTAGCTACGCCCATTCCTATGCTATGTGGCA
851 CACCCCAGGATTCTTGTGTGATAGGCCATTGGGGCCACGAGGAGCCACGT

901 CAGACGCCAAGCCACCCCGGCGAGACCAACCAGCCAATCGCAGTTCAGGA

951 AAAGATGACCTGCTATCCAAACCCAACTGTATAAAAGGCAGCTGCTGTGT
          *  *  *   *
1001 TCTGTTATGACACAGCCATCACACGCATACTGCATACACAACACAGAGCA
                                   M  A  A  A  T  M
1051 TCAGAACGAGCTACGATCTGATCGACATGGCTGCCGCCACCATGG
                                                 NcoI
```

_____ = secvențe CAT și TATA

* = Locuri posibile de start ai transcripției

Fig. 12

(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

REPRESOR GENETIC 434

PREZENT	ABSENT	SECVENȚA POZIȚIEI Sal I	
pPS1	pAD18	GTCGAACAAGAAAGTTTGTTCGAC	TIPUL SĂLBATIC 434 O_{R1}
pPS2	pAD16	GTCGAACAATATATATTGTTCGAC	"TIPUL SĂLBATIC" SINTETIC
pPS3	pAD17	GTCGATCAATATATATTTGATCGAC	"MUTANT" SINTETIC
pAD15.2	pAD14	G.....TCGAC	NO OPERATOR

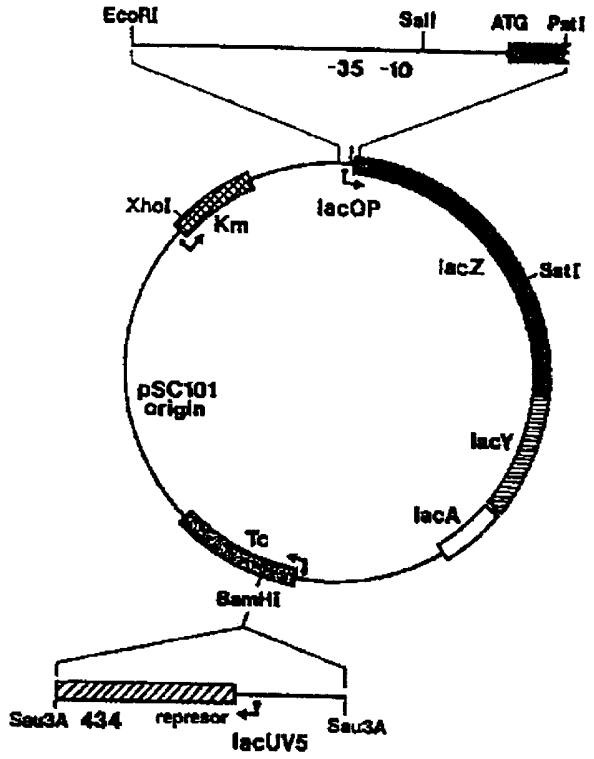


Fig. 13

(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

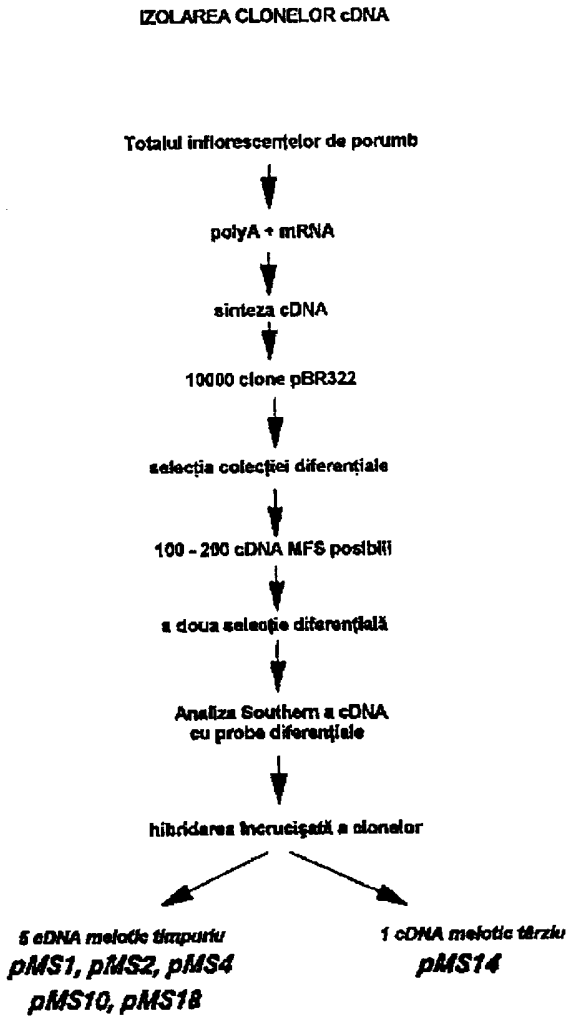


Fig. 14

(51) **Int.Cl.**[6] **C 12 N 15/82;**
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

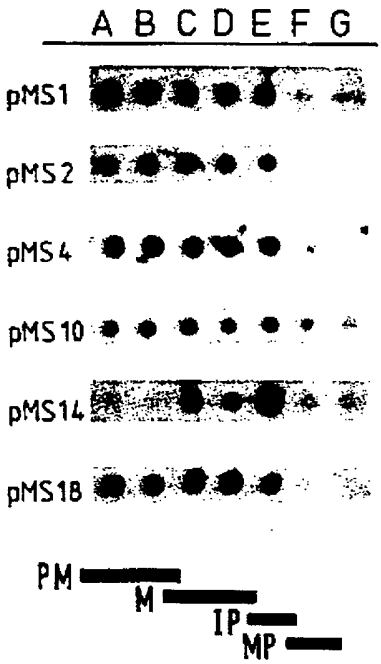


Fig. 15

(51) **Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;**
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29



Fig. 16A

(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

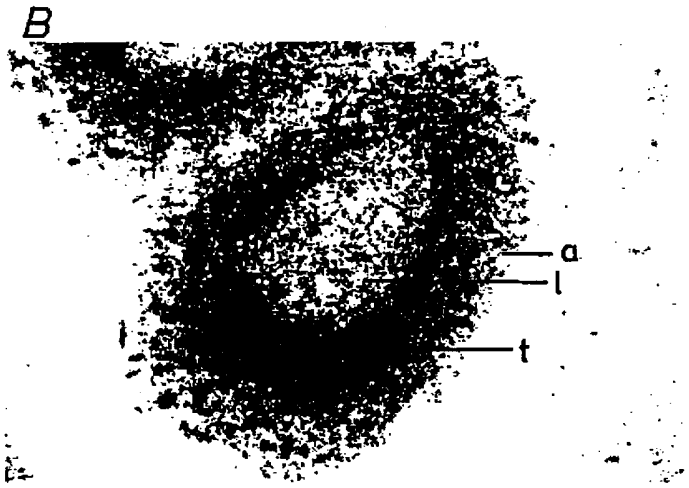


Fig. 16B



Fig. 16C

(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

Secvența de nucleotide și de aminoacizi corespunzătoare pentru clona cDNA pMS10 a florii masculine

```
          10          20          30          40
GGC CTT GCC CGC TCG TTC CCC TCG CCT CCC CGG TCG CGC CGC TCC

    50          60          70          80          90
CGC TGC CGC CGT GGC GAT TCC TGC CCG GCG GCG GCG CCG GGT TCA

         100         110         120         130
GGT CCA CGG CGG CGG CGG CTG CGC GGG GCG GGA CCG ACT ATG GGA
                                                 Met Gly

   140         150         160         170         180
CGG ACG ACA GCA AGA TCT CCC CCG ACG AGG AAT TCC TTC GAG GGC
Arg Thr Thr Ala Arg Ser Pro Pro Thr Arg Asn Ser Phe Glu Gly

         190         200         210         220
TGC GAC TAC AAC CAC TGG CTC ATC ACC ATG GAC TTC CCG GAC CCC
Cys Asp Tyr Asn His Trp Leu Ile Thr Met Asp Phe Pro Asp Pro

   230         240         250         260         270
AAG CCG TCG CGC GAA GAG ATG ATC GAG ACA TAC CTC CAG ACT CTC
Lys Pro Ser Arg Glu Glu Met Ile Glu Thr Tyr Leu Gln Thr Leu

         280         290         300         310
GCC AAG GTC GTC GGG AGT TAT GAG GAG GCC AAG AAG AGG ATG TAT
Ala Lys Val Val Gly Ser Tyr Glu Glu Ala Lys Lys Arg Met Tyr

   320         330         340         350         360
GCT TTT AGT ACG ACG ACT TAT GTT GGT TTT CAG GCT GTA ATG ACC
Ala Phe Ser Thr Thr Thr Tyr Val Gly Phe Gln Ala Val Met Thr

         370         380         390         400
GAG GAA ATG TCA GAA AAA TTT CGC GGT TTG CCT GGA GTA GTT TTC
Glu Glu Met Ser Glu Lys Phe Arg Gly Leu Pro Gly Val Val Phe

   410         420         430         440         450
ATT TTG CCT GAT TCA TAT CTA TAT CCA GAA ACA AAG GAG TAC GGA
Ile Leu Pro Asp Ser Tyr Leu Tyr Pro Glu Thr Lys Glu Tyr Gly

         460         470         480         490
GGA GAC AAA TAT GAC AAT GGT GTC ATC ACT CCA AGA CCA CCA CCT
Gly Asp Lys Tyr Asp Asn Gly Val Ile Thr Pro Arg Pro Pro Pro
```

Fig. 17

(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

```
   500          510          520          530          540
    |            |            |            |            |
GTT CAT TAT AGC AGA CCA TCA AGA ACT GAC AGG AAC CGT AAC TAC
Val His Tyr Ser Arg Pro Ser Arg Thr Asp Arg Asn Arg Asn Tyr

          550          560          570          580
           |            |            |            |
CGA GGA AAC TAC CAG GAT GGC CCT CCA CAG CAA GGA AAT TAC CAG
Arg Gly Asn Tyr Gln Asp Gly Pro Pro Gln Gln Gly Asn Tyr Gln

   590          600          610          620          630
    |            |            |            |            |
AAC AAC CGT CCT CCA CCA GAA GGT GGT TAC CAG AAC AAC CCG CCG
Asn Asn Arg Pro Pro Pro Glu Gly Gly Tyr Gln Asn Asn Pro Pro

          640          650          660          670
           |            |            |            |
CAG CAA GGA AAC TAC CAG ACA TAC CGC TCG CAG CAA GAT GGA AGA
Gln Gln Gly Asn Tyr Gln Thr Tyr Arg Ser Gln Gln Asp Gly Arg

   680          690          700          710          720
    |            |            |            |            |
GGC TAT GCC CCA CAG CAG AAT TAT GCA CAA GGT GGT CAG GAT GGT
Gly Tyr Ala Pro Gln Gln Asn Tyr Ala Gln Gly Gly Gln Asp Gly

          730          740          750          760
           |            |            |            |
AGA GGT TTT GGA AGG AAT GAT TAC ACA GAC CGT TCA GGC TAC AAT
Arg Gly Phe Gly Arg Asn Asp Tyr Thr Asp Arg Ser Gly Tyr Asn

   770          780          790          800          810
    |            |            |            |            |
GGA CCC ACT GAT TTT CGA AGT CAA ACT CAG TAC CAA GGG CAT GTA
Gly Pro Thr Asp Phe Arg Ser Gln Thr Gln Tyr Gln Gly His Val

          820          830          840          850
           |            |            |            |
AAT CCA GCT GGG CAA GGT CAA GGT TAC AAC AAC CCC CAA GAG CGT
Asn Pro Ala Gly Gln Gly Gln Gly Tyr Asn Asn Pro Gln Glu Arg

   860          870          880          890          900
    |            |            |            |            |
ACG AAC TTC TCG CAA GGG CAG GGA GGA GGT TTT AGG CCT GGT GGT
Thr Asn Phe Ser Gln Gly Gln Gly Gly Gly Phe Arg Pro Gly Gly

          910          920          930          940
           |            |            |            |
CCT TCA GCA CCT GGG TCT TAT GGC CAA CCA TCA GCA CCT GGA TCT
Pro Ser Ala Pro Gly Ser Tyr Gly Gln Pro Ser Ala Pro Gly Ser

   950          960          970          980          990
    |            |            |            |            |
TAT GGT CAA CCT AAT ACA CTT GGT AAC TAT GGG CAG GTA CCT CCA
Tyr Gly Gln Pro Asn Thr Leu Gly Asn Tyr Gly Gln Val Pro Pro
```

Fig. 17
(cont.)

(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

```
          1000         1010         1020         1030
TCA GTG AAT CCT GGT GGT AAC AGA GTT CCT GGT GTG AAT CCT AGT
Ser Val Asn Pro Gly Gly Asn Arg Val Pro Gly Val Asn Pro Ser

  1040         1050         1060         1070         1080
TAT GGT GGG GAT GGC AGA CAG GGG GCT GGA CCA GCA TAT GGT GGA
Tyr Gly Gly Asp Gly Arg Gln Gly Ala Gly Pro Ala Tyr Gly Gly

          1090         1100         1110         1120
GAT AAC TGG CAA AGA GGT TCT GGT CAG TAT CCT AGC CCA GGT GAA
Asp Asn Trp Gln Arg Gly Ser Gly Gln Tyr Pro Ser Pro Gly Glu

  1130         1140         1150         1160         1170
GGA CAA GGA AAC TGG CAG GGA AGG CAG TAA GAG CTG ACG TGT TCC
Gly Gln Gly Asn Trp Gln Gly Arg Gln

          1180         1190         1200         1210
ACT GAA GAC AAG AAT GGC ACT TGA GAT TTA GAA ATC TCC ATC TGT

  1220         1230         1240         1250         1260
AAA ATA AAC GAC TGT GAT GCA TTA CTC TTT TTT TTT TTC TTG CAT

          1270         1280         1290         1300
TTG AAC TCT AAA CTT ATG GGC ATG CGT TAT TAC CAA ACT ACG GAT

  1310         1320         1330         1340         1350
GCA AAT TCA TTT TAG TTT TTT GGG CCA AAT GTT GGC ATT TTT AAA

AAA
```

Fig. 17
(cont.)

(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

Secvenţa de nucleotide şi de aminoacizi corespunzătoare pentru clona cDNA pMS14 a florii masculine

```
          10          20          30          40
          |           |           |           |
GCA GGG GGG GGG GCA CAG CAA GCC AGC AGA GCA GAA AGC AGC CGC
Ala Gly Gly Gly Ala Gln Gln Ala Ser Arg Ala Glu Ser Ser Arg

    50          60          70          80          90
    |           |           |           |           |
AGC CCC AGC CCC CAC AAA GAC GAA GGC AAC AAT GGC GCT AGA AGC
Ser Pro Ser Pro His Lys Asp Glu Gly Asn Asn Gly Ala Arg Ser

          100         110         120         130
          |           |           |           |
AGC CAC GCC CCC CGC GCA CTC CTC GCG CGT GCC TCG TCC TGC TGG
Ser His Ala Pro Arg Ala Leu Leu Ala Arg Ala Ser Ser Cys Trp

   140         150         160         170         180
    |           |           |           |           |
TCC TCG GCG GCG GCA CCG GCC CGT CGT CGG TGC TCA GCG CGC CGG
Ser Ser Ala Ala Ala Pro Ala Arg Arg Arg Cys Ser Ala Arg Arg

          190         200         210         220
          |           |           |           |
GGC GCA GGA CCG GCG GCA GTG CCT GCC GCA GCT GAA CGC CTC CTG
Gly Ala Gly Pro Ala Ala Val Pro Ala Ala Ala Glu Arg Leu Leu

   230         240         250         260         270
    |           |           |           |           |
CGG TGC CGC GCG TAC CTG GTG CCG GCG CGC CGG ACC CCA GCG CGG
Arg Cys Arg Ala Tyr Leu Val Pro Ala Arg Arg Thr Pro Ala Arg

          280         290         300         310
          |           |           |           |
ACT GCT GCA GCG CTC ACG CGC CGT GTG CAC GAG TGC GCC TGC AGC
Thr Ala Ala Ala Leu Thr Arg Arg Val His Glu Cys Ala Cys Ser

   320         330         340         350         360
    |           |           |           |           |
ACC ATG GGC ATC ATC AAC AGC CTG CCC GGC CGG TGC CAC CTC GCC
Thr Met Gly Ile Ile Asn Ser Leu Pro Gly Arg Cys His Leu Ala

          370         380         390         400
          |           |           |           |
CAA GCC AAC TGC TCC GCT TGA AGC AGG GAC CTG GCA CGC GTG CTG
Gln Ala Asn Cys Ser Ala

   410         420         430         440         450
    |           |           |           |           |
CAA TGG ATG GCA GGA GGG GAG AGG AAT AAG AAG TGT TTC CAT TTC

          460         470         480         490
          |           |           |           |
ACA GTG AGA GCA GTC GAG CTC CAA CGT TGT CGT CGT CGT CGT CTT
```

Fig. 18

(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

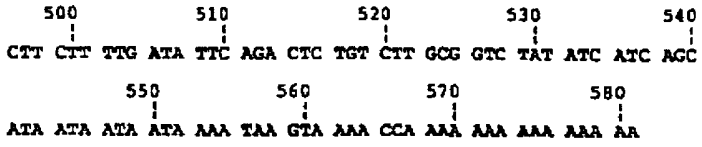


Fig. 18
(cont.)

(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

Secvenţa de nucleotide şi aminoacizi corespunzătoare pentru clona cDNA pMS16 a florii masculine

```
          10          20          30          40
ACA GCA GTA GCA AGA GGG ATA GAG CAA GGC CAC ACA CAC ACA CAC

    50          60          70          80          90
ACC ACT AGG CTA GGT TAG CCT TTT AAT CGT CGT CGA GAA GCA AGA

         100         110         120         130
AGG GCG CTG CAC CAA GCA GGC AAG CAA GAA GAG AGC CGA TCG ACC

   140         150         160         170         180
GAG AGC TAG CAC GCG ATG GCG AGG TCT TGC CAA GAT GAT GGT GGC
                Met Ala Arg Ser Cys Gln Asp Asp Gly Gly

         190         200         210         220
GCA CGT CTG CTG GCC TTG CGC TGG CGT GTC GAC CGC CGA GGC AGG
Ala Arg Leu Leu Ala Leu Arg Trp Arg Val Asp Arg Arg Gly Arg

   230         240         250         260         270
AAC ATC AAG ACC ACG ACG ACC GAG AAG AAG GAC GAC GCG GTG GTG
Asn Ile Lys Thr Thr Thr Thr Glu Lys Lys Asp Asp Ala Val Val

         280         290         300         310
CAG CCG CAG AGG TTC CGC CCT TCG ACC GCC TCG GCG CGG CGC GTC
Gln Pro Gln Arg Phe Arg Pro Ser Thr Ala Ser Ala Arg Arg Val

   320         330         340         350         360
CCC GGC GTT CGG CGG CCT CCC CGG CGG CAC GAT TCC TGG CAG CAG
Pro Gly Val Arg Arg Pro Pro Arg Arg His Asp Ser Trp Gln Gln

         370         380         390         400
CAT TCC CGG GTT CAG CAT GCC CGG CAG CGG CAG CAG CCT ACC CGG
His Ser Arg Val Gln His Ala Arg Gln Arg Gln Gln Pro Thr Arg

   410         420         430         440         450
GTT CAG CTT GCC CGG CAG CGG CAC GAT GCC CCT CTT CGG CGG CGG
Val Gln Leu Ala Arg Gln Arg His Asp Ala Pro Leu Arg Arg Arg

         460         470         480         490
CTC CCC GGG CTT CAG CGG CTT CGG CGG CAT GCC CGG GTC GCC CAC
Leu Pro Gly Leu Gln Arg Leu Arg Arg His Ala Arg Val Ala His
```

Fig. 19

(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

```
   500          510          520          530          540
    |            |            |            |            |
CGC CGG CTC CGT CCC CGA GCA CGC CAA CAA GCC CTG AAC GCC AAC
Arg Arg Leu Arg Pro Arg Ala Arg Gln Gln Ala Leu Asn Ala Asn

          550          560          570          580
           |            |            |            |
AAG CGT GGT AGT AGA GGT GCT ACT GTT ACT GTA GTA CGT CGT CGT
Lys Arg Gly Ser Arg Gly Ala Thr Val Thr Val Val Arg Arg Arg

   590          600          610          620          630
    |            |            |            |            |
CTT CAT GCA TGC GTG GTT CGT GGT TTC CCT AGC TCC ATA CGA GCA
Leu His Ala Cys Val Val Arg Gly Phe Pro Ser Ser Ile Arg Ala

          640          650          660          670
           |            |            |            |
GTA GTT GGG CTT GCA CGT ACC GTA CGT CTA GCT AGC TAT ATA TAT
Val Val Gly Leu Ala Arg Thr Val Arg Leu Ala Ser Tyr Ile Tyr

   680          690          700          710          720
    |            |            |            |            |
GCT TGT GTT CTA CTG CTT TTT AGT TTA ATT ACC TGC CTG CAT TGG
Ala Cys Val Leu Leu Leu Phe Ser Leu Ile Thr Cys Leu His Trp

          730          740          750          760
           |            |            |            |
AGA GTT GGA TCT GTT TCA TTT GGT GGT GTT TGC TTT ACT ATT AGG
Arg Val Gly Ser Val Ser Phe Gly Gly Val Cys Phe Thr Ile Arg

   770          780          790          800          810
    |            |            |            |            |
TCA GTA TCT GTT TGT GGA GAC TTG GTG TTT AAT TTA TTT AGC CGT
Ser Val Ser Val Cys Gly Asp Leu Val Phe Asn Leu Phe Ser Arg

          820          830          840          850
           |            |            |            |
TTG TGA CTG GTT GTA GCT AGC GGT GGT GCG GTG GTG ATG TTC TTG
Leu

   860          870          880          890          900
    |            |            |            |            |
AGG CAT GAA TAA TGC TAC ATG CAT GTG ATG TAT CCA TGT TTT GTG

          910          920          930
           |            |            |
TGT GGT AAA CCT GTT GTT TGT ATA AGC TGT CCC
```

Fig. 19
(cont.)

(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

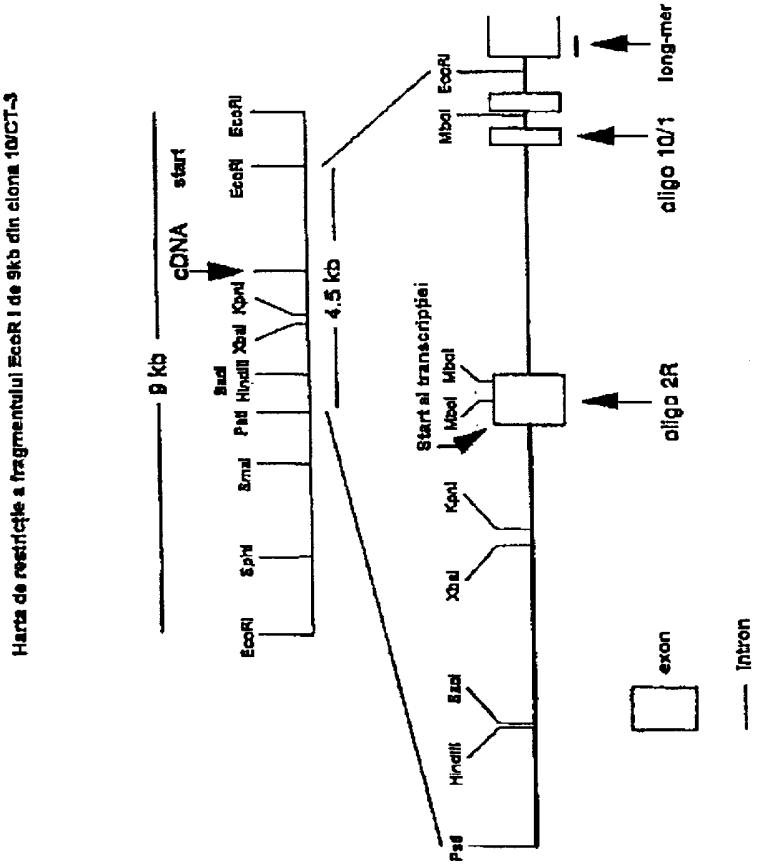


Fig. 20

(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

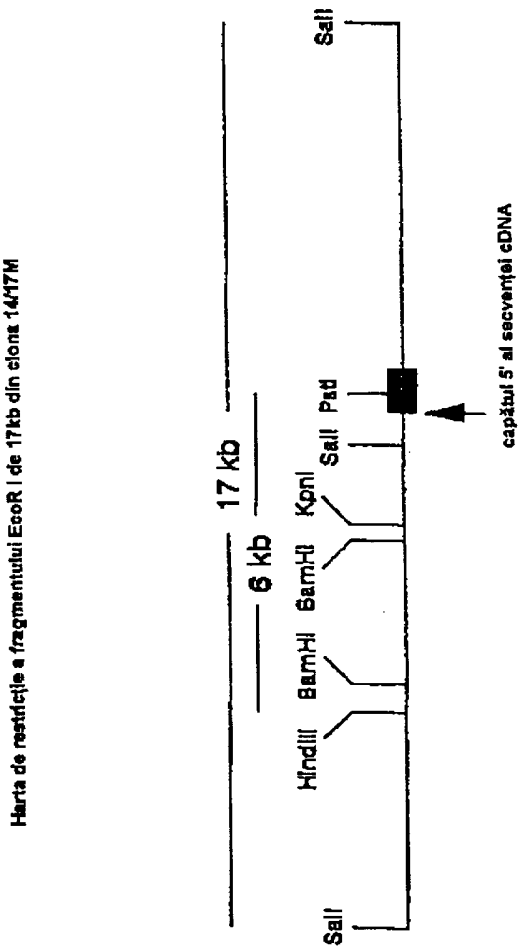


Fig. 21

(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

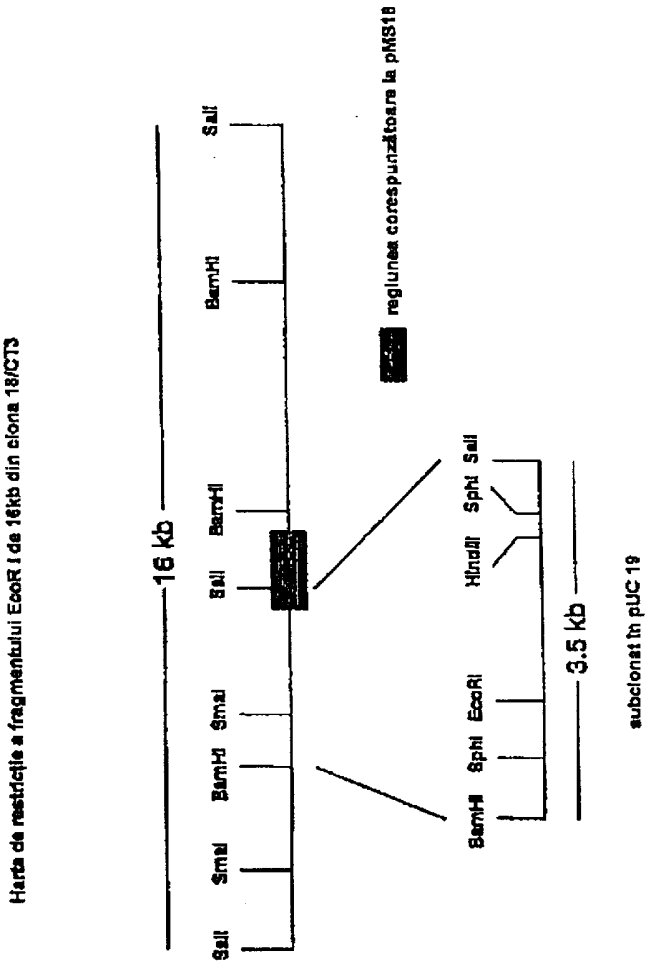
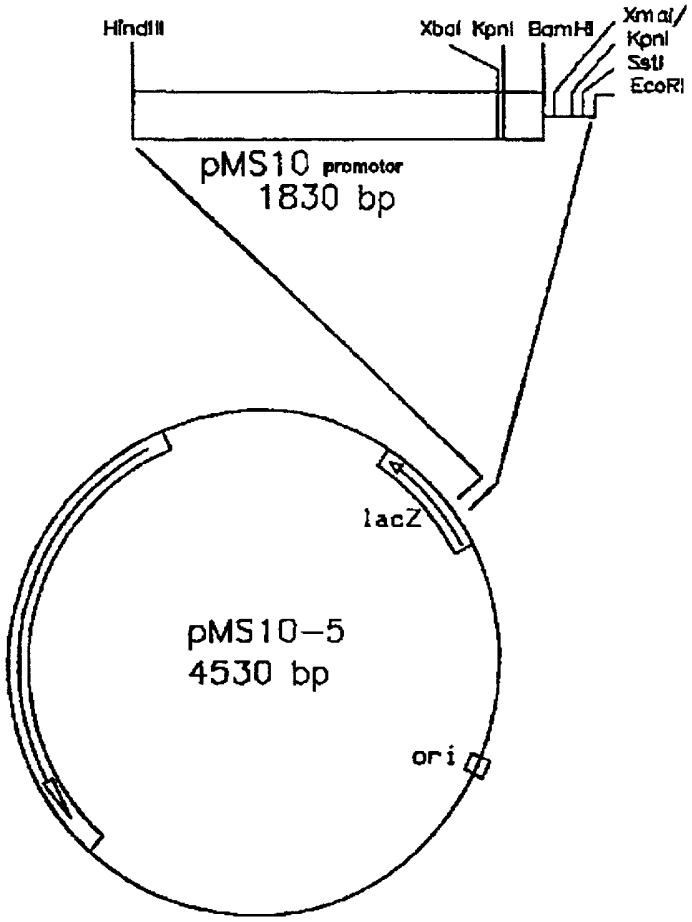


Fig. 22

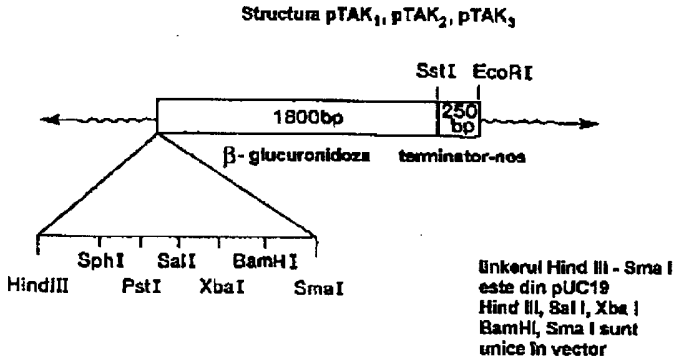
(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29



Clona **pMS10-5.**

Fig. 23

(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29



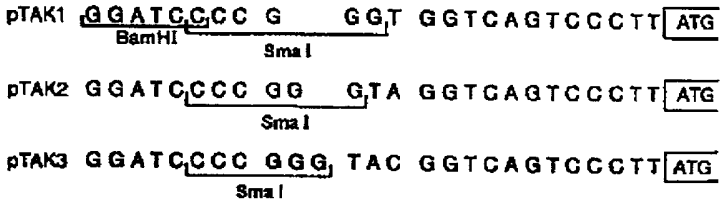


Fig. 24

(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

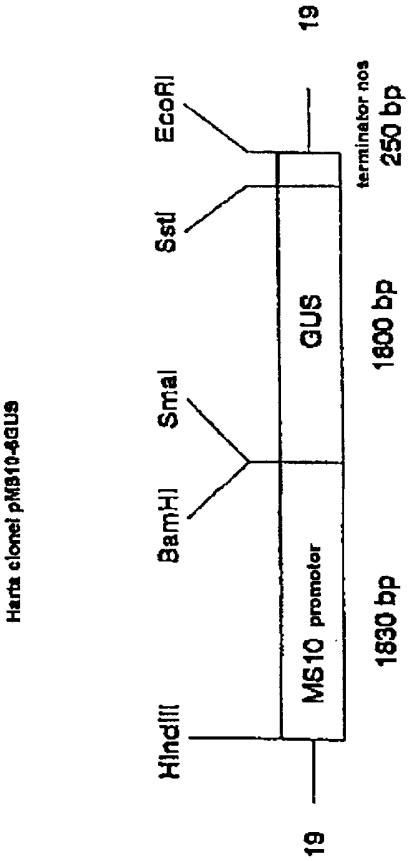


Fig. 25

(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

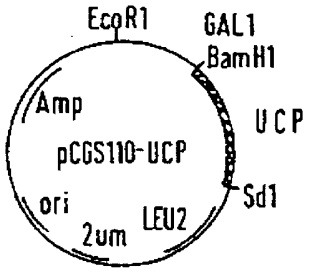


Fig. 26

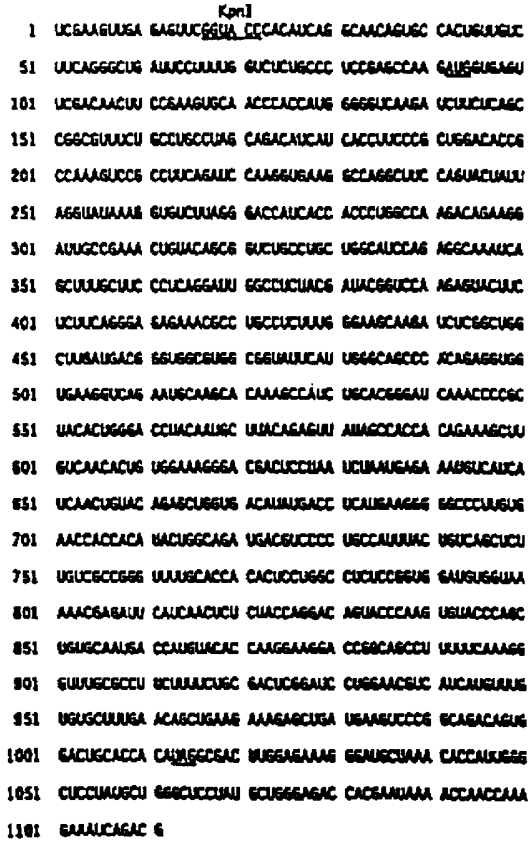


Fig. 27

(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

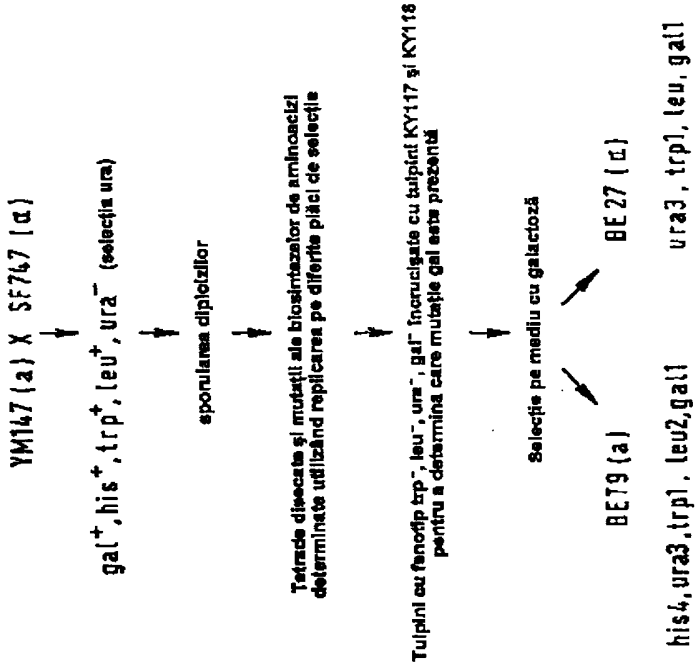


Fig. 28

(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

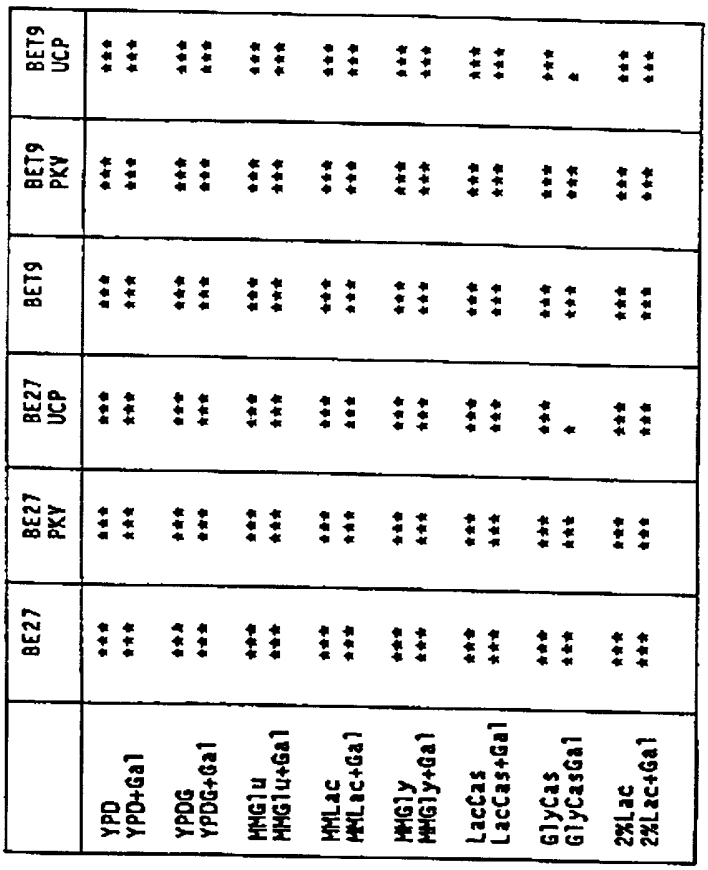


Fig. 29

(51) **Int.Cl.**[6] **C 12 N 15/82;**
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

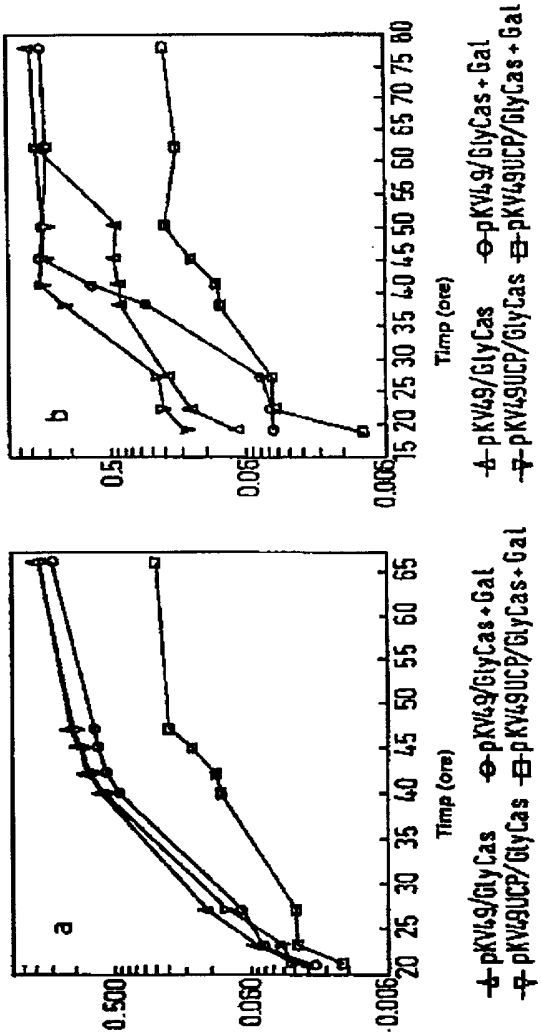


Fig. 30

(51) **Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;**
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

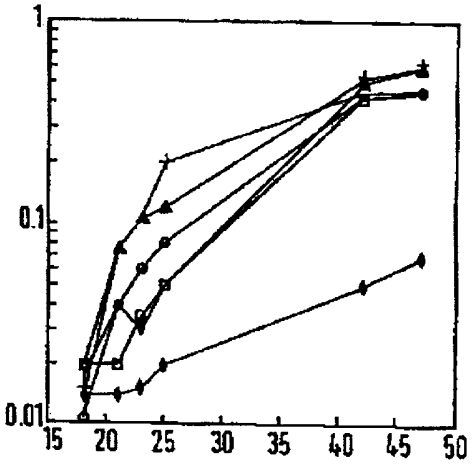


Fig. 31

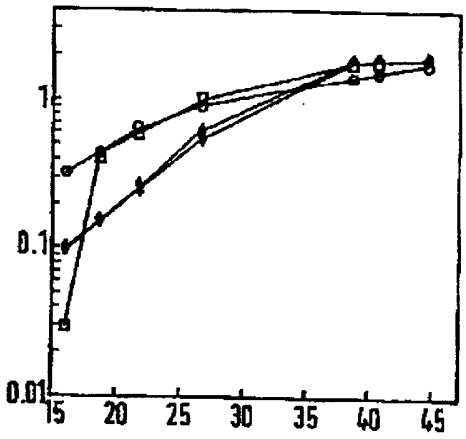


Fig. 32

(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

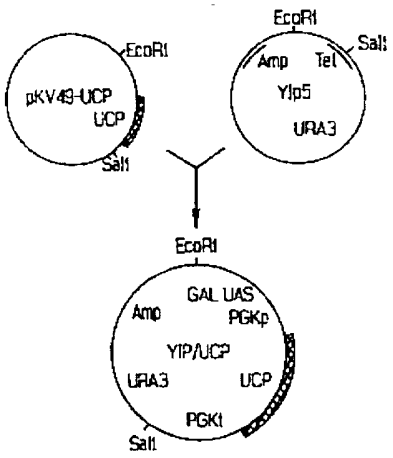
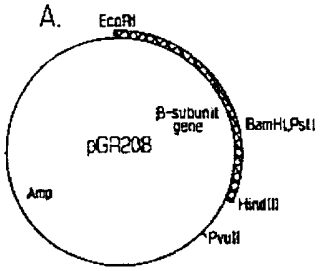


Fig. 33



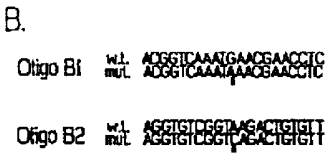


Fig. 34

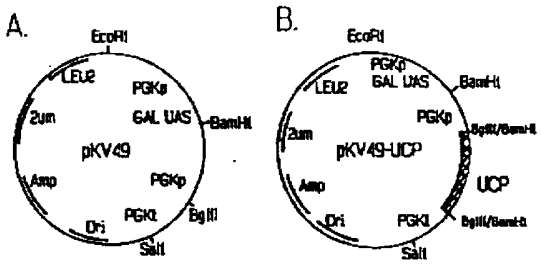
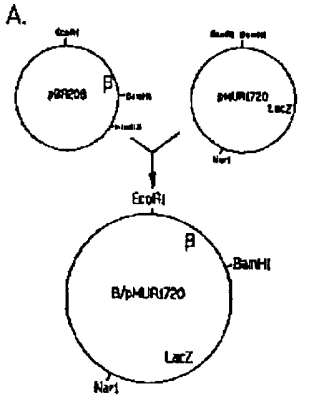


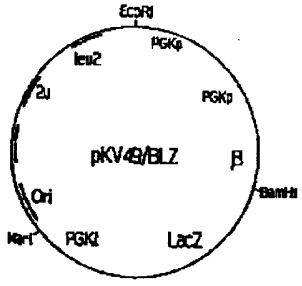
Fig. 35

(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29



Construcția proteinei de fuziune
subunitate - β/β - galactozidază

Fig. 36



Harta plasmidei construcției pKV49/BLZ

Fig. 37

(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

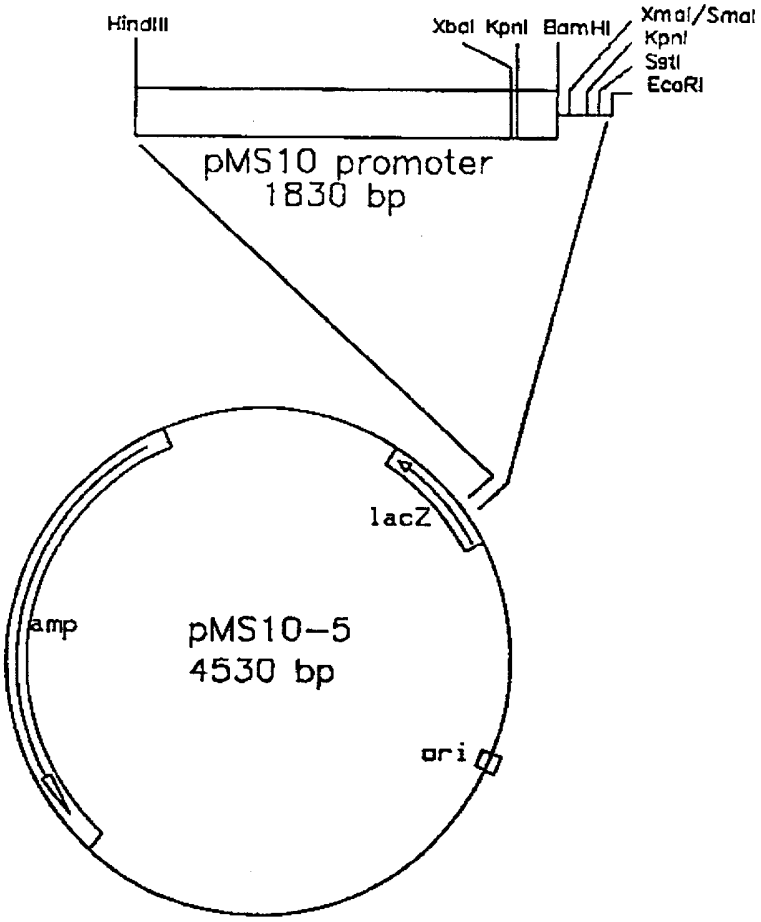


Fig. 38

(51) Int.Cl.[6] C 12 N 15/82;
C 12 N 5/10;
A 01 H 5/00;
C 12 N 15/54;
C 12 N 15/12;
C 12 N 15/55;
C 12 N 15/29

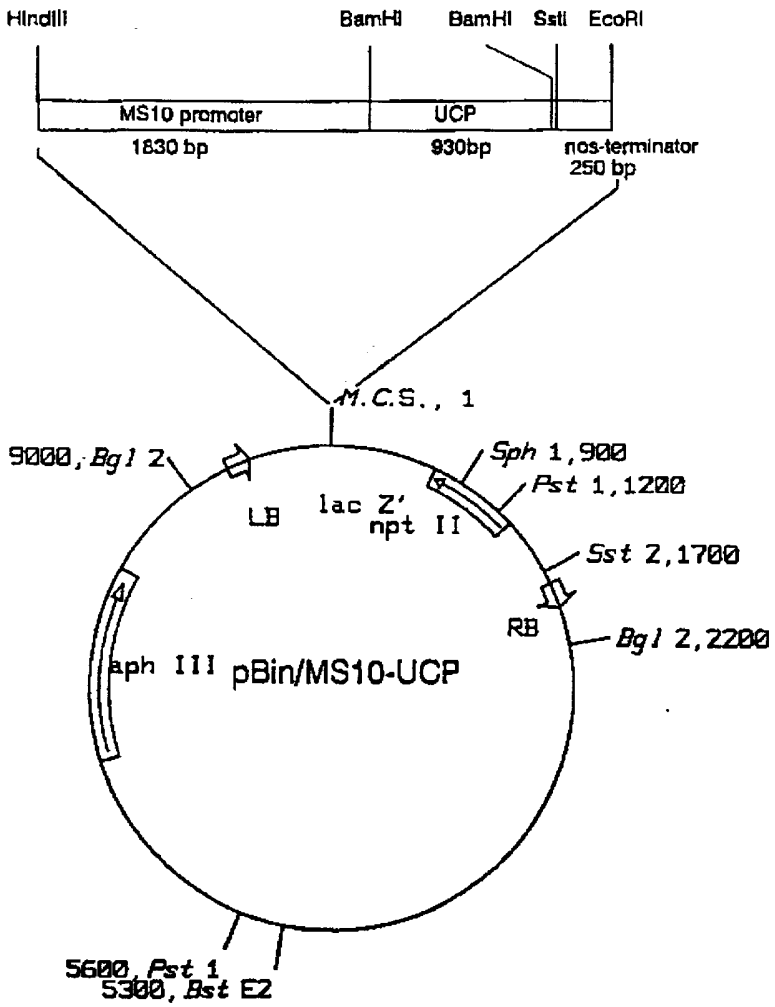


Fig. 39

Editare şi tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenţii şi Mărci