

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

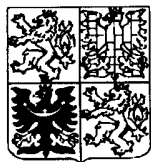
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

## 1746-99

(19)

ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **18. 11. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **18.11.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96NL/9600458**

(33) Země priority: **WO**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15. 09. 99**  
**(Věstník č. 9/99)**

(86) PCT číslo: **PCT/NL96/00458**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 98/22600**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>:

**C 12 N 15/82**  
**C 12 N 15/52**  
**A 01 H 5/00**

(71) Přihlášovatel:

AVEBE, Foxhol, NL;

(72) Původce:

Van Der Meer Ingrid Maria, Amsterdam, NL;

Vorst Oscar Frederik Josef, Utrecht, NL;

Bruinenberg Peter Martin, Hoogezand, NL;

Sanders Johannes Pieter Marinus,

Groningen, NL;

Van Tunen Adrianus Johannes,

Wageningen, NL;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1,

Praha 4, 14000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Chimerní konstrukce dvou genů,  
expresivní vektor, transgenní rostlina  
nebo její části s přirozeně vysokým  
obsahem vody, které nadměrně produkuje  
alespoň dvě aminokyseliny aspartátové  
rodiny a způsob získání takové rostliny**

(57) Anotace:

Popisuje se chimerní konstrukce dvou genů obsahujících sekvenci nukleové kyseliny kódující enzym, který vykazuje aktivitu aspartátové kinázy /AK/ a sekvenci nukleové kyseliny kódující enzym s aktivitou dihydrodipikolinátové syntázy /DHPS/. Tato konstrukce je schopna odlišné exprese dvou genů, což vede k pětinašobnému zvýšení množství jak lyzinu tak threoninu ve srovnání s produkcí každé aminokyseliny v rostlině divokého typu nebo v její části.

CZ 1746-99 A3

Chimerní konstrukce dvou genů, expresivní vektor, transgenní rostlina nebo její části s přirozeně vysokým obsahem vody, které nadměrně produkují alespoň dvě aminokyseliny aspartátové rodiny a způsob získání takové rostliny.

43424

### Oblast techniky

Vynález se týká chimerní konstrukce dvou genů, která umožňuje dosáhnout zvýšené produkce lyzinu a treoninu a zvýšeného množství metioninu, aniž dojde k poškození rostliny, ve které se konstrukce exprimuje.

### Dosavadní stav techniky

Lidé a zvířata s jedním žaludkem nejsou schopny syntetizovat 9 z 20 aminokyselin, a proto potřebují dietetický zdroj těchto podstatných aminokyselin. Potrava lidí a chovných zvířat je založena z velké části na rostlinném materiálu. Mezi podstatné aminokyseliny, které jsou nenahraditelnou součástí výživy lidí a zvířat, patří lyzin a <sup>N</sup>treonin. V rostlinných zemědělských plodinách se však často tyto aminokyseliny vyskytují v nízké koncentraci. Proto se často do potravin, jejichž základem je zrno a zelenina, často přidávají syntetické aminokyseliny, aby se zvýšila jejich nutriční hodnota.

V minulosti se pokoušely zvýšit množství volného <sup>N</sup>treoninu a lyzinu v rostlinách metodami klasického šlechtění a selekcí mutantů, ale nedosáhlo se příliš velkého úspěchu. Také se vědci pokoušeli v jedné transgenní rostlině současně zvýšit produkci <sup>N</sup>treoninu a lyzinu způsobem molekulové genové modifikace. Zvýšení množství volného lyzinu prokázalo, že působí zvýšení akumulace volného <sup>N</sup>treoninu (Shaul, O. and Galili, G. (1993) Plant Mol. Biol. 23: 759-768; Falco S.C. et al., (1995), Bio/Technology 13: 577-582). Dodnes nebyla popsána <sup>N</sup>zvýšená produkce metioninu.

Popisuje se chimerní konstrukce dvou genů obsahující sekvenci nukleové kyseliny kódující enzym s aktivitou aspartátové kinázy (AK) a sekvenci nukleové kyseliny, která kóduje enzym vykazující aktivitu dihydrodipikolinátové syntázy (DHPS). Tato konstrukce je schopná produkovat diferenciální expresi dvou genů, což vede ke zvýšení množství jak lyzinu tak treoninu více jak 5-krát ve srovnání s množstvím každé uvedené aminokyseliny v rostlině divokého typu nebo v její části. Tato konstrukce také umožňuje zvýšit možné množství metioninu. Uvedená exprese je nyní možná, aniž vzniknou dřívější problémy spojené s vysokou akumulací lyzinu nebo s kombinovanou expresí obou genů AK a DHPS v rostlině. Exprese se reguluje tak, že lyzin a treonin se produkuje ve srovnatelném rozsahu, aniž se poškodí rostlina, to znamená, že ve srovnání s rostlinami divokého typu nedojde k negativním aberacím fenotypu. Konstrukce, která poskytuje zvýšené množství lyzinu a treoninu také umožňuje dosáhnout zvýšeného množství metioninu.

Biosyntéza aminokyselin aspartátové rodiny.

Základní aminokyseliny, jako jsou lyzin, treonin a metionin se syntetizují z aspartátu komplexním způsobem, který je v případě bakterií a vyšších rostlin podobný (obrázek č. 1). Průběh syntézy aspartátové rodiny se detailně charakterizoval v bakteriích *Escherichia coli* izolací enzymů, které se účastní uvedené dráhy. Tyto enzymy se později izolovaly z vyšších rostlin (Bryan, J.K. (1980), *The Biochemistry of Plants* (ed. B.J. Mifflin) Vol. 5: 403-452, Academic Press, N.Y.; Umbarger, H.E. (1978) *Ann. Rev. Biochem.* 47: 533-606).

Rychlost syntézy aminokyselin aspartátové rodiny se reguluje primárně komplexním procesem inhibice aktivity některých enzymů se zpětnou vazbou relevantním aminokyselinovým konečným produktem. Nejdříve je enzymatická aktivita, která je běžná pro všechny aminokyseliny aspartátové rodiny, což je aktivita aspartátové kinázy (AK), inhibována se zpětnou vazbou lyzinem

a treoninem. Lyzin také navíc inhibuje aktivitu enzymu dihydrodipikolinátové syntázy (DHPS), což je první enzym dráhy po rozvětvení, který vede ke syntéze lyzinu. Treonin inhibuje aktivitu homoserinové dehydrogenázy (HSD), což je první enzym účastnící se biosyntézy treoninu (Matthews, B. F. et al., (1989) *Plant Physiol.* 91: 1569-1574).

Enzym aspartátová kináza (AK) katalyzuje fosforylaci aspartátu za vzniku 3-aspartylfosforečnanu, přičemž dochází k hydrolýze ATP. V bakteriích *E. coli* a v rostlinách se identifikovalo několik různých enzymů AK, které diferenciatně inhibují buď lyzin nebo treonin. Ukázalo se, že AK-III, což je produkt lokusu *lysC* v bakteriích *E. coli*, se skládá ze dvou stejných podjednotek jako homodimér (Cassan, M., et al. (1986), *J. Biol. Chem.* 261: 1052-1057; Richaud, C. et al., (1973) *Eur. J. Biochem.* 40: 619-629). Gen *LysC* z bakterie *E. coli* se klonoval a sekvenoval (Cassan, M., et al. (1986), *J. Biol. Chem.* 261: 1052-1057).

Produkt aktivity AK, což je 3-aspartylfosforečnan, se v dalším enzymatickém kroku převádí na 3-aspartátový semialdehyd (3-ASA), který slouží jako běžný substrát pro syntézu lyzinu a treoninu. Enzym dihydrodipikolinátová syntáza (DHPS) katalyzuje první reakci, která je při biosyntéze lyzinu jediná, a to kondenzaci 3-aspartátsemialdehydu s pyruvátem za vzniku 2,3-dihydrodipikolinátu. V bakteriích *E. coli* je tento enzym kódován lokusem *dapA* a ukazuje se, že obsahuje čtyři identické podjednotky jako homotetramér (Shedlarski, J.G. and Gilvarg, C. (1970) *J. Biol. Chem.* 245: 1362-1373). Gen *dapA* bakterií *E. coli* se klonoval a sekvenoval (Richaud, F. et al., (1986) *J. Bacteriol.* 166: 297-300). Enzym DHPS v rostlinách je jediný enzym srovnatelný s enzymem bakterií *E. coli*. V případě hlavních regulačních enzymů dráhy aspartátové rodiny v rostlinách, DHPS je nejcitlivější na zpětnovazebnou inhibici svým konečným produktem ( $I_{50}$  DHPS v případě rozmezí lyzinu mezi 10 a 50  $\mu\text{M}$ ). Rostlinný DHPS je ve srovnání

s rostlinnými AK ( $I_{50}$  v případě rozmezí lyzinu mezi 100 a 700  $\mu\text{M}$ ) přibližně 10-krát citlivější na inhibici lyzinem. Rostlinný DHPS je přibližně 100-krát citlivější k lyzinové inhibici, než DHPS bakterie *E. coli* ( $I_{50}$  je přibližně 1mM) (Yugari, Aby and Gilvarg, C. (1962) *Biochem. Biophys. Acta* 62: 612-614; Galili G., (1995) *The Plant Cell* 7: 899-906).

Homoserinová dehydrogenáza (HSD) katalyzuje první reakci, která je specifická pro syntézu treoninu, metioninu a izoleucinu. Vyšší rostliny v obecném případě mají alespoň dvě formy HSD: formu, která je citlivá na treonin a formu, která na něj citlivá není (Bryan, J.K. (1980), *The Biochemistry of Plants* (ed. B.J. Mifflin) Vol. 5: 403-452, Academic Press, N.Y.; Lea, P. J. et al. (1985) *Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids* (ed. G. C. Barrett): 197-226, London: Chapman and Hall).

Několik důkazů ukazuje, že rostlinný AK je enzym omezující rychlost syntézy treoninu, zatímco DHPS je hlavní enzym omezující rychlost syntézy lyzinu. Zjistilo se, že mutanty několika rostlinných druhů vykazující zpětnovazebně necitlivý AK izozym, nadměrně produkují volný treonin a vykazují pouze slabě zvýšené množství lyzinu (Bright, S. W. J. et al., (1982) *Nature* 299: 278-279; Cattoir-Reynaerts A. et al., (1983) *Biochem. Physiol. Pflanzen* 178: 81-90; Dotson, S. B. et al., (1990) *Planta* 182: 546-552; Frankard, V. et al. (1992) *Plant Physiol.* 99. 1285-1293). Na druhé straně zpětnovazebně necitlivý DHPS, což je mutant rostliny tabáku, vykazoval nadměrnou produkci lyzinu (Negrutiu, I. Et al., (1984) *Theor. Appl. Genet.* 6: 11-20). Podobné výsledky se zaznamenaly s transgenními rostlinami, které exprimují zpětnovazebně necitlivý DHPS nebo AK z bakterií *E. coli* (Glassman, K. F. (1992) *Biosynthesis and Mol. Regul. Of Amino Acids in Plants* (ed. B. K. Singh et al.): 217-228; Perl, A. et al., (1992) *Plant Mol. Biol.* 19: 815-823; Shaul, O. and Galili, G. (1992a) *Plant J.* 2: 203-209; ; Shaul, O. and Galili, G. (1992b) *Plant.*

Physiol. 100: 1157-1163). Transgenní rostliny, které exprimují AK bakterií *E. coli*, produkují v nadměrné míře treonin a vykazují pouze slabý vzrůst množství lyzinu. Studie transgenních rostlin také ukazují, že AK a DHPS nejsou regulovány pouze zpětnovazebnou inhibicí, ale že množství těchto enzymů také omezuje rychlost produkce treoninu a lyzinu. Podstatně pozitivní korelace v transgenních rostlinách se detekovala mezi množstvím bakteriálních enzymů AK a DHPS a množstvím volného treoninu a lyzinu (Shaul, O. and Galili, G. (1992a) Plant J. 2: 203-209; ; Shaul, O. and Galili, G. (1992b) Plant. Physiol. 100: 1157-1163).

Transgenní rostliny exprimující jak zpětnovazebně necitlivou AK tak zpětnovazebně necitlivou DHPS (Shaul, O. and Galili, G. (1993) Plant Mol. Biol. 23: 759-768) obsahují množství volného lyzinu, které je daleko vyšší než se vyskytuje v rostlinách, jenž exprimují pouze zavedenou necitlivou AK nebo DHPS. Uvedený vzrůst množství lyzinu je také doprovázen podstatnou redukcí akumulace treoninu, což se porovnává s transgenními rostlinami, které exprimují pouze necitlivou AK. To znamená, že když DHPS se stává neregulovaným, větev vedoucí k syntéze lyzinu silně soupeří s jinými větvemi dráhy syntézy a podstatné množství 3-aspartátového semialdehydu se tak převádí na lyzin na účet treoninu. Stejných výsledků se dosáhlo křížením mutantu, který nadměrně produkuje lyzin, s mutantem nadměrně produkujícím treonin charakterizovaným změněnou regulací DHPS a AK (Frankard, V. et al. (1992) Plant Physiol. 99. 1285-1293).

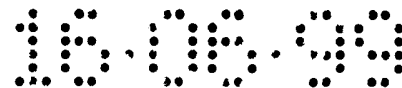
Přihláška Evropského patentu č. 485.970 popisuje způsob zvýšení množství volného treoninu a lyzinu. Tento způsob zahrnuje zavedení prvního chimerního genu do rostlinných buněk, přičemž gen obsahuje sekvenci DNA kódující enzym vykazující aktivitu AK, a zavedení druhého chimerního genu, jenž obsahuje sekvenci DNA kódující enzym s aktivitou DHPS. Oba chimerní geny dále obsahují sekvenci DNA umožňující

expresi enzymů v rostlinných buňkách a následné cílení enzymů do chloroplastu.

Přihláška Evropského patentu č. 93908395 popisuje dva izolované fragmenty DNA, které obsahují fragment kódující AK, která není citlivá na inhibici lyzinem, a druhý fragment kódující DHPS, který je alespoň 20-krát méně citlivý na inhibici lyzinem ve srovnání s rostlinnou DHPS. Obsahem nároků je skutečnost, že AK citlivá na lyzin způsobuje produkci treoninu vyšší než je v normálním případě a že DHPS způsobuje v transformovaných rostlinách produkci lyzinu vyšší než je v normálním případě.

Ukázalo se však, že transgenní rostliny exprimující zpětnovazebně necitlivou DHPS pocházející z bakterie *E. coli*, nadměrně produkují lyzin a že transgenní rostliny exprimující AK z *E. coli* nadměrně produkují treonin (Glassman, K. F. (1992) Biosynthesis and Mol. Regul. Of Amino Acids in Plants (ed. B. K. Singh et al.): 217-228; Perl, A. et al., (1992) Plant Mol. Biol. 19: 815-823; Shaul, O. and Galili, G. (1992a) Plant J. 2: 203-209; ; Shaul, O. and Galili, G. (1992b) Plant. Physiol. 100: 1157-1163), pak kombinování těchto dvou genů v transgenních rostlinách nikdy nevedlo ke srovnatelnému vzrůstu množství treoninu a lyzinu. V publikaci Shaul, O. and Galili, G. (1993) Plant Mol. Biol. 23: 759-768 se popisuje, že autoři získali transgenní rostliny exprimující jak zpětnovazebně necitlivou AK tak zpětnovazebně necitlivou DHPS křížením transgenních rostlin, které exprimují jednotlivě každý z těchto enzymů. Ukázalo se, že tyto rostliny obsahují množství volného lyzinu, které zdaleka nepřesahuje množství v rostlinách, které exprimují pouze necitlivou DHPS. Zvýšení množství lyzinu je však doprovázeno ve srovnání s rostlinami exprimujícími pouze necitlivou AK podstatnou redukcí akumulace treoninu.

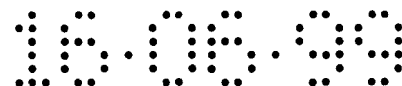
Stejných výsledků se dosáhlo, když zpětnovazebně necitlivé bakteriální enzymy DHPS a AK, které jsou kódovány genem *dapA*



bakterie *Corynebacterium* a mutantním genem *lysC* bakterie *E. coli*, se společně exprimovaly v transgenní kanole a v semenech soji. V semenech se pozorovalo několika set násobné zvýšení množství volného lyzinu, zatímco akumulaci nadbytečného treoninu v transgenních semenech, které exprimují samotnou zpětnovazebně necitlivou AK, se předešlo společnou expresí s DHPS (Falco S.C. et al., (1995), *Bio/Technology* 13: 577-582). Dále se v transgenních rostlinách, kde se koncentrace volného lyzinu zvýšila v celé rostlině více jak 10-krát vzhledem ke koncentraci lyzinu v netransformovaných rostlinách, projevil abnormální fenotyp (Glassman, K. F. (1992) *Biosynthesis and Mol. Regul. Of Amino Acids in Plants* (ed. B. K. Singh et al.: 217-228 Shaul, O. and Galili, G. (1992a) *Plant J.* 2: 203-209; Frankard, V. et al. (1992) *Plant Physiol.* 99. 1285-1293).

V přihlášce Evropského patentu č. EP 435970 se popisuje, že exprese obou genů zpětnovazebně necitlivé AK a DHPS se řídila stejným konstitutivním promotorem CaMV35S. Také v experimentech, které se popisují v publikacích Falco S.C. et al., (1995), *Bio/Technology* 13: 577-582; Shaul, O. and Galili, G. (1993) *Plant Mol. Biol.* 23: 759-768, se společně exprimovala v transformovaných rostlinách zpětnovazebně necitlivá AK a DHPS, přičemž se exprese těchto dvou genů řídila stejným promotorem.

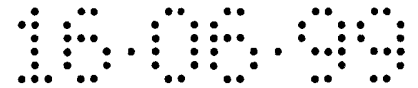
Problémy, které vznikají při použití technologie genových manipulací za účelem zvýšení množství volného lyzinu a treoninu v rostlinách, se popisují v publikaci Falco S.C. et al., (1995), *Bio/Technology* 13: 577-582. Také se ukázalo, že použití stejného promotoru specifického pro semeno při řízení exprese zpětnovazebně necitlivé AK a DHPS vedlo pouze ke zvýšení obsahu lyzinu v semenech kanoly a soji. Dále se v uvedené publikaci popisuje, že semena transformantů akumulující nejvyšší množství lyzinu vykazují abnormální



vzhled a málo klíči (popisuje se v publikaci Falco S.C. et al., (1995), Bio/Technology 13: 577-582).

#### Podstata vynálezu

Následující hypotéza se předkládá na základě zjištění uvedených v předcházejících člancích. Poměr mezi syntézou lyzinu a treoninu v rostlinách se reguluje alespoň dvěma faktory: Prvním faktorem je dostupnost 3-ASA, který je běžným substrátem dvou klíčových enzymů specifických pro syntézu treoninu a lyzinu (respektive homoserinová dehydrogenáza a DHPS). Druhým faktorem je soutěžení mezi těmito dvěma klíčovými enzymy v případě 3-ASA, přičemž tato látka je pro ně běžný substrát. Množství 3-ASA se zdá být určeno aktivitou AK. V případě, že je v transgenních rostlinách je nadměrně exprimován zpětnovazebně necitlivá AK, může se vyšší koncentrace 3-ASA vést do větve syntézy treoninu, což může také vést ke zvýšení množství metioninu. Jestliže se DHPS stává zpětnovazebně necitlivou pak větve vedoucí k syntéze lyzinu silně soutěží s jinou větví dráhy a podstatné množství 3-ASA se tak převádí na lyzin na úkor syntézy treoninu. Za účelem zvýšení množství volného treoninu a lyzinu v transgenních rostlinách na požadované množství se musí striktně regulovat načasování a síla exprese každého zavedeného zpětnovazebně necitlivého genu. Produkce jiné aminokyseliny než je metionin aspartátové cesty se také zvýší. Vzhledem k vynálezu se exprese sekvence nukleové kyseliny kódující enzym vykazující aktivitu aspartátové kinázy (AK) a sekvence nukleové kyseliny kódující enzym vykazující aktivitu dihydrodipikolinové syntázy (DHPS) reguluje tak, že exprese dvou sekvencí se liší v síle a že exprese sekvence kódující AK je silnější než sekvence kódující DHPS. Toho je možné dosáhnout použitím promotorů s různou silou nebo dokonce použitím stejných promotorů, přičemž DHPS regulační promotor obsahuje zesilovač. Vynález popisuje vznik rostlin, které

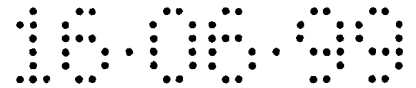


nadměrně produkují treonin a lyzin ve srovnatelném rozsahu. Dále se popisuje nadměrná produkce metioninu. Toho lze dosáhnout za použití speciálních sekvencí podle vynálezu metodami rekombinace DNA, které jsou dobře známy v oboru, jako je například transformace rostlinných buněk.

Upřednostňuje, aby exprese sekvencí kódujících DHPS a AK se regulovala v různých stádiích vývoje rostlin tak, že rostlina má šanci se vyvinout a dozrát, aniž dojde k interferenci s nadměrně produkovanou volnou aminokyselinou, zvláště s nadměrně produkovaným lyzinem. Toho lze dosáhnout řadou způsobů.

První způsob je regulace sekvence kódující DHPS indukovatelným promotorem, který je možno indukovat po té, co se začne exprimovat sekvence kódující AK. Sekvence kódující AK se může také přirozeně regulovat indukovatelným promotorem. Existuje však omezení, že silnější expresivní systém se použije pro sekvenci kódující AK a že k expresi DHPS dochází v pozdějším stádiu, než je v případě sekvence kódující AK. Zvláště se preferuje indukce sekvence kódující DHPS v okamžiku, kdy rostlina dosáhla dostatečného stupně zralosti a nebude proto negativně ovlivněna nadměrnou produkcí lyzinu.

Druhý způsob, jak dosáhnout exprese v různých stádiích je regulace exprese promotory, které jsou asociovány s buněčnými typy nebo orgány a řídí přirozenou expresi v odlišných stádiích vývoje rostliny. Vhodnými příklady promotorů pro sekvenci kódující DHPS jsou promotory spojené s procesy, ke kterým dochází v pozdějších stádiích vývoje rostliny nebo dokonce ve stádiu zralosti. Promotory spojené s plody a hlízami jsou vhodné při regulaci exprese sekvence kódující DHPS. Sekvence kódující AK se může také regulovat uvedenými promotory, ale je omezena tím, že pro sekvenci kódující AK se použije silnější exprimující systém, než je tomu v případě sekvence kódující DHPS. Upřednostňuje se také provedení vynálezu, kde sekvence kódující DHPS se exprimuje později, než



sekvence kódující AK, což se může provést použitím indukovatelného promotoru.

Za účelem řízení exprese zpětnovazebně necitlivé AK v celé rostlině a ve všech stádiích vývoje orgánů je možné použít velmi silný konstitutivní promotor, což vede k vyšší koncentraci 3-ASA, který se odvede do větve syntézy treoninu a způsobí nadměrnou produkci treoninu a metioninu. Tento postup se může dále kombinovat s tím, že zpětnovazebně necitlivý enzym DHPS se může exprimovat pouze slabě a v pozdějším stádiu vývoje, například ve specifických orgánech rostlin. Exprese sekvence kódující AK může být konstitutivní, ale může být také omezena na specifické orgány.

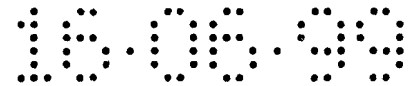
Sekvence kódující AK se může exprimovat ve stejných orgánech jako sekvence kódující DHPS, avšak obě kódující sekvence se musí exprimovat odděleně. Vzhledem k tomu, že exprese DHPS probíhá později a je slabší, větev vedoucí k syntéze lyzinu podléhá soutěžení s jinými větvemi průběhu syntézy jen slabě a pouze během dobře definovaného období vývoje. Proto dochází k nadměrné produkci lyzinu i treoninu. Nadměrně se produkuje také metionin, který se účastní aspartátového průběhu.

Je výhodné, za účelem dosažení velmi vysokého množství lyzinu, například desetinásobku nebo vyššího množství, než je normální, aby se sekvence kódující DHPS exprimovala ve specificky cílených orgánech, a tím se předejde negativním projevům fenotypu rostliny. Takové cílové orgány, které se v rostlině vyvíjejí později v době zrání, jsou například hlízy, semena, plody a květy. Protože se lyzin nadměrně produkuje pouze ve specificky cílených orgánech rostlin, jako je například hlíza, zbytek rostliny se vyvíjí normálně, aniž se objeví jiný fenotyp.

Exprese sekvence kódující DHPS přednostně probíhá ve specifických rostlinných orgánech s vysokým obsahem vody. To je také výhodné, protože dochází minimálnímu poškození fenotypu. Mezi takové orgány patří hlízy, plody, květy a

listy. Upřednostňuje se , aby tyto orgány obsahovaly více než 70 % vody, výhodnější je, aby obsah vody byl vyšší jak 80 %. Skutečnost, že se sekvence kódující DHPS exprimuje ve specifických orgánech s vysokým obsahem vody nese také výhodu, že požadované aminokyseliny jsou ve vodních frakcích snadno rozpustné a jsou tedy snadno dostupné po sklizni. Z toho důvodu je výhodné, aby se gen kódující AK také exprimoval v rostlinných orgánech s vysokým obsahem vody. Nejvýhodnější je, aby se dva geny exprimovaly s oblastí překryvu exprese, která se nachází v rostlinném orgánu s vysokým obsahem vody, ve kterém se exprimuje sekvence kódující DHPS. Upřednostňuje se, aby sklizeň orgánu bohatého na vodu byla snadno proveditelná. Takovým orgánem jsou například hlízy, květy, kořeny nebo listy.

Uvedený orgán je možné použít jako zdroj nutrientů obsahující vysoký obsah aspoň dvou aminokyselin aspartátové rodiny vybrané ze skupiny zahrnující metionin, lyzin a treonin nebo se může zpracovat extrakcí, přičemž se získá vodní frakce. Uvedená vodní frakce obsahuje vysoký obsah alespoň dvou aminokyselin aspartátové rodiny vybrané ze skupiny zahrnující metionin, lyzin a treonin. Rostlina jako taková nebo její část obsahující orgán bohatý na vodu se může sklídit a použít jako potravina nebo jako potravinový doplněk a/nebo se zpracuje v procesu extrakce vody. Taková vodní frakce získaná z rostliny nebo z rostlinného orgánu podle vynálezu se může v podstatě použít jako zdroj nutrientů. Je známa řada jednoduchých ekonomicky výhodných extrakčních postupů, například při produkci ovocných nebo zeleninových džusů. Tak je možné vyrobit ovocné nebo zeleninové šťávy způsobem, který je dobře znám v oboru. Tyto ovocné nebo zeleninové šťávy mají však podstatně vysokou nutriční hodnotu, což je způsobeno přítomností vysokého obsahu alespoň dvou aminokyselin aspartátové rodiny vybraných ze skupiny zahrnující metionin, lyzin a treonin.



Rostliny nebo části rostlin například plody, květy, hlízy, kořeny nebo listy podle vynálezu jako takové jsou zvláště vhodné pro vegetariány, čímž se zaručí automatické podání dvou základních aminokyselin. Navíc vodní frakce z rostlin nebo z jejich částí, které obsahují orgány bohaté na vodu, kde se exprimuje kombinace genů podle vynálezu, znamená jednoduše získatelný zdroj s vysokým obsahem alespoň dvou aminokyselin aspartátové rodiny vybrané ze skupiny zahrnující metionin, lyzin a treonin, z nichž aminokyseliny produkované v nadměrném množství dají snadno získat. Zvýšené množství metioninu tvoří v první řadě snadno získatelný zdroj metioninu. Nyní je možné snadno získat metionin, lyzin a treonin.

Vynález se týká chimerní konstrukce dvou genů, která obsahuje:

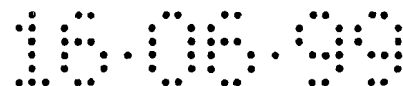
- (a) sekvenci nukleové kyseliny kódující enzym vykazující aktivitu aspartátové kinázy (AK),
- (b) sekvenci nukleové kyseliny kódující enzym vykazující aktivitu dihydrodipikolinátové syntázy (DHPS),
- (c) sekvenci regulující expresi kódující sekvence popsané v odstavci (a) operabilně spojenou s uvedenou sekvencí,
- (d) sekvenci regulující expresi kódující sekvence popsané v odstavci (b) operabilně spojenou s uvedenou sekvencí, uvedená sekvence regulující expresi (c) a (d) je taková, že exprese dvou sekvencí se liší vzájemně silou a exprese kódující sekvence (AK) (a) probíhá vyšší rychlostí ve srovnání se sekvencí kódující DHPS (b).

To znamená, že (c) je silnější než (d). Navíc sekvence (a) a (b) chimerní konstrukce se dvěma geny musí každá obsahovat sekvenci nukleové kyseliny (e) kódující tranzitní peptid, který se podílí na translokaci proteinu z cytozolu do plastidů (Van den Broek, G. Et al., (1985) Nature 313: 358-363; Schreier, P. H. et al., (1985) EMBO J. 4: 25-32), což je organela, ve které probíhá v rostlinách syntéza lyzinu a většiny treoninu. Tato sekvence nukleové kyseliny kódující chloroplastový tranzitní peptid fúzovaný s kódujícími

sekvencemi (a) a (b) bude produkovat v cytoplazmě tranformované rostlinné buňky fúzovaný chimerní protein AK/tranzitní peptid nebo DHPS/tranzitní peptid, který bude transportován do plastidů, kde se získá zvýšená produkce jak treoninu tak lyzinu. Podle vynálezu se může použít sekvence nukleové kyseliny kódující libovolný plastidový transitní peptid. Vhodným příkladem jsou sekvence DNA odvozené z ferredoxinového genu, které kódují cílení proteinů do chloroplastového stroma (Smeekens, S. et al., (1985a) Nucl. Acids Res. 13: 3179-3194) a sekvence z plastocyaninového genu, které kódují cílení proteinů do chloroplastového lumenu (Smeekens, S. et al., (1985b) Nature 317: 456-458). Preferovaná sekvence DNA kódující cílení AK a DHPS do plastidů kóduje tranzitní peptid pocházející z genu hrachu *rbcS-3A* (obrázek č. 2; Fluhr, R. et al., (1986) EMBO J. 5: 2063-2071). 3'konec sekvence nukleové kyseliny kódující tranzitní peptid je fúzován se sekvencí kódující AK nebo DHPS.

Sekvence kódující AK a DHPS (a) a (b) se musí naopak také fúzovat se signálem pro terminaci transkripce DNA (g) a (h). Tento terminační signál obsahuje signál ukončení 3'transkripce a mRNA polyadenylace. Mohou se použít terminační signály přítomné v oblasti sousedící se 3'koncem klónovaného genu, například z genu hrachu *rbcS*, z fazolového genu *faseolinu* nebo z genu *nopalinové syntázy* odvozené z plazmidu Ti bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Upřednostňuje se terminační sekvence pocházející z oblasti lemující 3'konec genu *oktopinové syntázy* z plazmidu Ti bakterie *Agrobacterium tumefaciens* (obrázek č. 2; Greve, H. D. et al., (1983) J. Mol. Appl. Genet. 1: 499-511).

Je výhodné, aby genová konstrukce podle vynálezu obsahovala sekvenci regulující expresi (d) v případě sekvence nukleové kyseliny (b), přičemž regululační sekvence umožňuje expresi DHPS v pozdějším stádiu během vývoje ve srovnání s expresí sekvence nukleové kyseliny (a). V případě alternativního



provedení vynálezu sekvence regulující expresi (d) je sekvence, která nevede ke konstitutivní expresi. S výhodou se používá sekvence vedoucí k expresi v jednom nebo více specifických rostlinných orgánech. Příkladem je hlíza, květy, plody, kořeny nebo stonek. Existují preference sekvence, která reguluje expresi v orgánech bohatých na vodu.

Sekvenčí regulující expresi (c) v případě sekvence nukleové kyseliny (a) může být sekvence, která je schopná silné exprese kódující sekvence (a) v ranném stadiu vývoje rostliny a/nebo rostlinného orgánu. Sekvenčí regulující expresi (c) v případě sekvence nukleové kyseliny (a) může být sekvence, která je schopná silné exprese kódující sekvence (a) ve všech rostlinných buňkách nebo rostlinných orgánech. Sekvenčí regulující expresi (c) je vhodný konstitutivní promotor. Takovým konstitutivním promotorem může být promotor 35S kvěťákového mozaikového viru (CaMV).

Sekvence regulující expresi (c) může obsahovat ne pouze promotor, ale také sekvenci zesilující expresi. Jestliže to je případ sekvence regulující expresi (d), může obsahovat stejný promotor nebo promotor stejné síly, jako má sekvence regulující expresi (c), přičemž síla exprese kódujících sekvencí (a) a (b) jsou odlišné.

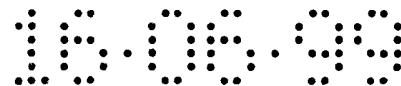
Sekvence regulující expresi, zvláště pak promotory, se mohou nacházet v 5' oblasti každé z kódujících sekvencí (a) a (b). Mohou se přidat na 3' konec promotorové krátké sekvence nukleové kyseliny, což reprezentuje 5'mRNA nepřekládanou sekvenci. Dojde k zesílení translace mRNA přepsané z chimerních genů. Příkladem je omega sekvence odvozená z genu potahového proteinu tabákového mozaikového viru (Gallie, D.R. et al., (1987) Nucl. Acids Res. 15: 3257-3273) nebo zesilovače translace alfalfa mozaikového viru (Brederode, F. T. et al., (1980) Nucl. Acids Res. 8: 2213-2223).

Vhodným zesilujícím promotorem v případě sekvence regulující expresi (c), který řídí expresi sekvence kódující enzym AK (a)

podle vynálezu je zesílený promotor květákového mozaikového viru (CaMV) 35S (Benfey, P. N. et al., (1990) EMBO J. 9: 1685-1696; Pen, J. et al (1992) Bio/Techn. 10: 292-296). V tomto promotoru je zesilovací sekvence dvakrát, což ho činí silným promotorem, který řídí expresi konstitutivně v celé rostlině ve všech stádiích vývoje. Může se použít libovolný jiný promotor, který řídí silnou konstitutivní expresi.

Promotory v případě sekvencí regulující expresi (c) a (d) mohou pocházet z buď jednoděložních nebo dvouděložních rostlin. Upřednostňuje se, aby se používaly tkáňově specifické promotory, ale nemusí být tkáňově specifické. Při řízení exprese zpětnovazebně necitlivé AK (a) je možné použít stejný tkáňově specifický promotor v sekvenci regulující expresi (d), která reguluje expresi DHPS (b), v případě, že fúzoval se zesilovačem.

Vhodná orgánově specifická regulující sekvence (d) pro řízení exprese sekvence kódující enzym DHPS (b) podle vynálezu je patetinový promotor třídy I specifický pro hlízy pocházející z mikroorganismu *Solanum tuberosum* (Mignery, C. A. et al. (1988) Gene 62: 27-44; Wenzler, H. C. et al., (1989) Plant Mol. Biol. 12: 41-50). Při řízení exprese enzymu DHPS se mohou použít jiné promotory specifické pro hlízy. Je to například promotor proteinázového inhibitoru II v případě brambor (Keil, M. et al., (1989) EMBO J. 8: 1323-1330) nebo inhibitor katepsinu D z brambor (Herbers, K. et al., (1994) Plant Mol. Biol. 26: 73-83). Mohou se také použít jiné tkáňově specifické promotory, jako promotor specifický pro plody pocházející z polygalakturonidázového genu rajčat (Grierson, D. et al., (1986) Nucl. Acids Res. 14: 8595-8603), dále je to pro semena specifický fazeolinový promotor pocházející z fazolí (Sengupta-Gopalan, C. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3320-3324) nebo pro kořeny specifická subdoména promotoru CaMV 35S (Benfey, P. N. et al., (1990) EMBO J. 9: 1685-1696).



Sekvence regulující expresi (c) a (d) mohou obě obsahovat indukovatelné promotory. Upřednostňuje se, aby se indukční stimuly dvou promotorů lišily, aby mohlo dojít k odlišné expresi dvou kódujících sekvencí, se kterými je operabilně spojen. Jinými příklady indukovatelných promotorů je slabý indukovatelný promotor získaný z genu *rbcS* z hrachu (Coruzzi, G. Et al. (1984) EMBO J. 3: 1671-1679) a aktinový promotor z rýže (McElroy, D. et al., (1990) The Plant Cell 2: 163-171). Kódující sekvence nukleové kyseliny (a) a (b) se může odvodit z libovolného vhodného zdroje, například z různých rostlinných buněk nebo z bakterií nebo může jít o syntetickou kódující sekvenci. V preferovaném provedení vynálezu taková sekvence (a) kóduje enzym, který je méně citlivý k inhibici lyzinem a uvedená sekvence (b) kóduje enzym, který je ve srovnání s odpovídajícími enzymy rostliny divokého typu, méně náchylný k inhibici treoninem. Je vhodné, aby se takové sekvence získaly z endogenních organismů. Výhodné exogenní zdroje jsou bakterie, např. *E. coli*. Vhodnou sekvencí nukleové kyseliny (a) kódující aktivitu AK je sekvence DNA mutantního genu *LysC* z *E. coli*, která kóduje izoenzym AK-III. Tento enzym je ve srovnání z rostlinným enzymem méně citlivý na lyzin (Boy, E. et al., (1979) Biochimie 61: 1151-1160; Cassan, M., et al. (1986), J. Biol. Chem. 261: 1052-1057). Vhodná sekvence nukleové kyseliny (b) kódující enzym DHPS je gen *dapA* z bakterie *E. coli* (Richaud, C. et al., (1973) Eur. J. Biochem. 40: 619-629). Výsledný produkt exprese je ve srovnání s rostlinným enzymem DHPS méně citlivý k inhibici lyzinu. Sekvence kódující mutované rostlinné enzymy, které jsou méně citlivé ke zpětnovazebné inhibici jsou také vhodným provedením vynálezu sekvencí, jenž se mohou použít.

Chimerní konstrukce dvou genů může tak obsahovat dvě kódující sekvence, které kódují AK a DHPS a které jsou řízeny odlišnými promotory. Oba se nacházejí na stejném binárním vektoru (obrázek č. 2). Část chimerní genové konstrukce kódující AK má

v 5'oblasti spojené s 5'koncem sekvence DNA omega silný (zesílený) promotor 35S kvěťákového mozaikového viru; sekvence DNA omega je spojená s 5'koncem sekvence DNA kódující chloroplastový tranzitní peptid získaný z genu *rbcS-3A* z hrachu, který je spojen s 5'koncem kódující sekvence mutantní alely *lysC* bakterie *E. coli*, jenž kóduje necitlivou AK-III, která je spojena s 5'koncem terminátorové sekvence oktopinové syntázy.

Část chimerní genové konstrukce kódující DHPS má v základu stejnou strukturu, přičemž silný konstitutivní promotor genové konstrukce AK je nahrazen slabším pro hlízy specifickým promotorem patatinu pocházejícím z brambor a gene *lysC*, který kóduje necitlivou AK-III je nahrazen genem *dapA* bakterie *E. coli* kódující DHPS.

Vynález také popisuje expresivní vektor obsahující chimerní konstrukci dvou genů podle vynálezu libovolného provedení.

Transgenní rostliny obsahující ve svých buňkách uvedenou konstrukci dvou genů také spadá do rozsahu vynálezu.

Preferovanými rostlinami jsou ty, které vykazují vysoký obsah vody nebo jejich části mají vysoký obsah vody: například hlízy, listy, stonky, plody, kořeny nebo květy. Mezi vhodné rostliny patří rostliny brambor, cukrové řepy, traviny a rostliny, které poskytují ovoce nebo zeleninu pro přípravu ovocné nebo zeleninové šťávy. Příklady vhodného ovoce jsou jablka, pomeranče, grepy, hroznové víno, rajčata, mango, banány, meloun, jahody, třešně a kiwi. Příklady vhodné zeleniny jsou brambory a cukrová řepa. Za vhodnou se považuje libovolné jiné ovoce nebo zelenina, které obsahuje podobné množství vody.

Upřednostňují se rostliny nebo jejich části odvozené z rostlin nebo z rostlinných částí, které jsou v normálním případě přijatelné pro konzumaci za účelem produkovat lyzin a treonin určený ke konzumaci. Z ekonomických důvodů se pro získání vodní frakce preferují rostliny, které poskytují nejvyšší

množství vodní frakce na plošnou výměru za jednotku času při nejnižší ceně. Tento faktor se bude měnit podle země v závislosti na klimatických a geografických vlivech. Může se použít rostlina, která se už běžně pěstuje nebo nemusí jít o běžně pěstovanou rostlinu, která se však stává zajímavou po zavedení genové konstrukce podle vynálezu.

Části rostlin obsahující orgány bohaté na vodu jsou schopny exprimovat konstrukci dvou genů podle vynálezu tvoří preferované provedení vynálezu v případě rostlinných částí, jako jsou rostlinné buňky, které se mohou vyvinout v rostlinné buňky orgánů s vysokým obsahem vody. Preferovanými rostlinnými částmi jsou také orgány s vysokým obsahem vodu jako takové. Mezi vhodné orgány patří květy, hlízy a plody.

Rostliny a rostlinné buňky podle vynálezu produkují jako průvodní jev vysoké množství treoninu a lyzinu. Rostliny podle vynálezu nebo rostlinné buňky podle vynálezu produkují v nadměrném množství metionin. Upřednostňuje se nadměrná produkce alespoň dvou aminokyselin aspartátové rodiny. U rostlin nebo rostlinných částí podle vynálezu se upřednostňuje, aby se lyzin produkoval pouze ve specifických orgánech s vysokým obsahem vody. V případě rostlin, jejich částí nebo rostlinných buněk podle vynálezu, které exprimují více jak desetinásobné množství volného lyzinu ve srovnání s divokým typem, se upřednostňuje, aby sekvence kódující DHPS se exprimovala pouze v orgánech, jenž se vyvíjí v pozdní fázi růstu, což jsou hlízy, semena, plody a květy. Rostlinná tkáň získaná z transgenních rostlin nebo z rostlinných buněk podle vynálezu také spadá do rozsahu vynálezu.

V jiném provedení vynálezu se popisují transgenní rostlinné buňky, které obsahují nebo jsou transformovány expresivním vektorem podle vynálezu.

Obě uvedené chimerní genové konstrukce se mohou sub-klónovat do expresivních vektorů, jako jsou plazmidy *Ti* mikroorganismu *Agrobacterium tumefaciens*. Preferovaným plazmidem je binární

vektor pBINPLUS (Van Engelen, F.A. et al., (1995) Transgenic Research 4: 288-290).

Expresivní vektor, do kterého se klónovala konstrukce dvou genů, se pak zavede do rostlinných buněk. Uvedená transformace buněk se může uskutečnit za použití různých protokolů, které umožňují přenos DNA do buněk jednoděložných nebo dvouděložných rostlin. Transformace rostlinných buněk přímým transferem DNA se může uskutečnit například elektroporací (Dekeyser, R.A. et al., (1990) The Plant Cell 2: 591-602), precipitací za použití PEG (Hayashimoto, A. et al., (1990) Plant Physiol. 93: 857-863) nebo bombardováním částicemi (Gordon-Kann, W. J. et al., (1990) The Plant Cell 2: 603-618). Transfer DNA do rostlinných buněk může proběhnout infekcí bakteriemi *Agrobacterium*. Preferovanou metodou je infekce rostlinných buněk bakterií *Agrobacterium tumefaciens* (Horsch, R. B. et al., (1985) Science 227: 1229-1231; Visser, R. G. F. (1991) Plant Tissue Culture Manual B5 (ed. K. Lindsey): 1-9, Kluwer Acad. Publishers, The Netherlands). Metody používané v příkladech v případě rostlin brambor a cukrové řepy se může upravit pro shora v textu uvedené rostliny, jako jsou rajčata a jabloně.

Transformované rostliny se pak izolují na základě rezistence na kanamycin nebo jiná antibiotika, jako je hygromycin. Selektce rostlinných buněk nebo rostlin, které nadměrně produkují treonin, lyzin a metionin může také provést přidáním treoninu, lyzinu a metioninu do růstového média rostlin.

Rostliny, které obsahují ve svých buňkách AK a DHPS komponenty genové konstrukce podle vynálezu se mohou také získat křížením transgenní rostliny obsahující pouze genovou konstrukci AK (a) s transgenní rostlinou obsahující pouze genovou konstrukci DHPS (b) s odpovídajícími sekvencemi regulujícími expresi (c) a (d). Oddělené genové konstrukce mohou zahrnovat terminační sekvence a/nebo transitní sekvence, jak se popisují shora v textu, chimerní konstrukce dvou genů.

### Přehled obrázků na výkrese

**Obrázek č. 1** zobrazuje graf biosyntetické cesty aspartátové rodiny. Na obrázku jsou znázorněny pouze hlavní klíčové enzymy a jejich produkty. Zakřivené šipky představují zpětnovazebnou inhibici konečného produktu aminokyselin. Zkratka DHPS znamená dihydrodipicolinátová syntáza; HDS je homoserinová dehydrogenáza; TDH je treoninová dehydratáza.

**Obrázek č. 2A** zobrazuje konstrukci pAAP30.

**Obrázek č. 2B** zobrazuje konstrukci pAAP31.

**Obrázek č. 2C** zobrazuje konstrukci pAAP50.

**Obrázek č. 2D** zobrazuje konstrukci pAAP60.

### Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Konstrukce chimerní konstrukce dvou genů za účelem exprese AK a DHPS.

Za použití standardních metod se provedla izolace DNA, subklonování, restriční analýza a sekvenční analýza DNA (Sambrook, J. et al., (1989) *Molecular Cloning. A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al., (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons).

Chimerní gen obsahující gen *lysC* se zkonstruoval fúzí zesíleného promotoru CaMV35S s chimerním genem *lysC*. Tato chimerní konstrukce *lysC* obsahuje fragment DNA mutantní alely *lysC*, která fúzovala s 5' koncem sekvence DNA omega obalového proteinu tabákového mozaikového viru (Gallie, D.R. et al., (1987) *Nucl. Acids Res.* 15: 3257-3273). Downstream sekvencí *lysC* se začlenil terminační signál genu oktopinové syntázy z bakterie *Agrobacterium tumefaciens* (Greve, H. D. et al., (1983) *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 499-511). Mezi DNA omega a sekvencí kódující *lysC* se začlenil fragment DNA obsahující sekvenci kódující tranzitní peptid hrachu *rbcS-3A* (Fluhr, R. et al., (1986) *EMBO J.* 5: 2063-2071). Chimerní konstrukce genu

lysC se klónovala jako fragment BamHI/SpeI do plazmidu pBluescript (Stratagen). Zesílený promotor CaMV35S (Benfey, P. N. et al., (1990) EMBO J. 9: 1685-1696) se ligoval jako fragment SmaI/BamHI před chimerní gen lysC štěpený BamHI/XbaI ve fragmentu XbaI/SmaI binárního vektoru pBINPLUS (Van Engelen, F.A. et al., (1995) Transgenic Research 4: 288-290) (pAAP30; obrázek č. 2A).

Chimerní gen obsahující gen Dap se zkonstruoval fúzí zesíleného promotoru CaMV35S s chimerním genem DapA. Tat Van Engelen, F.A. et al., (1995) Transgenic Research 4: 288-290). Tato chimerní konstrukce DapA obsahuje fragment DNA genu DapA bakterie *E. coli* (Richaud, F. et al., (1986) J. Bacteriol. 166: 297-300), který fúzoval s 5'koncem sekvence DNA omega pocházející s obalového proteinu tabákového mozaikového viru (Gallie, D.R. et al., (1987) Nucl. Acids Res. 15: 3257-3273). Downstream sekvencí DapA se začlenil terminační signál genu oktopinové syntázy z bakterie *Agrobacterium tumefaciens* (Greve, H. D. et al., (1983) J. Mol. Appl. Genet. 1: 499-511). Fragment DNA obsahující sekvenci kódující tranzitní peptid rbcS-3A hrachu se začlenil mezi DNA omega a sekvenci kódující DapA. Chimerní konstrukce genu DapA se klónovala jako fragment BamHI/SpeI do plazmidu pBluescript (Stratagen). Patatinový promotor se ligoval jako HindIII/BamHI fragment s tupým koncem před chimerní gen DapA štěpený restrikcčními enzymy SmaI/BamHI (pAAP31; obrázek 2B).

Konstrukce dvou genů vznikla ligací chimerního genu patatinu dapA jako fragment KpnI/SacI zpAA31 do binárního vektoru se zesíleným CaMV35S-LysC (pAAP30) štěpeným restrikcčními enzymy SacI/KpnI (pAAP50; obrázek č. 2C).

Příklad 2: Zavedení chimerních genů do rostlin brambor.

### 2.1 Transformace rostlin brambor.

Binární vektor pAAP50 se použil transformaci zmrazením-rozmrazením bakterií *Agrobacterium tumefaciens* kmen AGL0

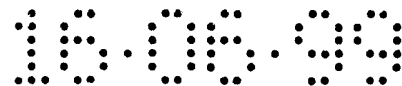
(Hofgen, R. and Willmitzer, L. (1988) Nucl. Acids. Res. 16:9877). Transformovaný AGL0 se následně použil pro inokulaci diploidních bramborových stonkových explantátů (*Solanum tuberosum*, odrůda Kardal), způsobem, který se popisuje v publikaci Visser, R. G. F. (1991) Plant Tissue Culture Manual B5 (ed. K. Lindsey): 1-9, Kluwer Acad. Publishers, The Netherlands. Po regeneraci výhonků a kořenů na médiu obsahujícím kanamycin se rostliny umístily do půdy a přenesly se do skleníku. Jako kontrola slouží rostliny regenerované ze stonkových explantátů (na médiu bez kanamycinu), kterým chybí binární vektor a na než se aplikuje kmen *Agrobacterium* AGL0.

## 2.2 Tvorba hlíz in vitro

Za účelem indukovat tvorbu hlíz in vitro se řízky obsahující nodus (okolo 4-5 cm dlouhé) transformovaných rostlinek umístily vertikálně do pevného média doplněného 10% (hmotnost/objem) sacharózou, 5  $\mu$ M BAP (popisuje se v publikaci Murashige, T. and Skoog, F. (1962) Physiol. Plant. 15: 473-497). Kultury se držely ve tmě při teplotě 19 °C. Po 14 dnech se sklídily maličké hlízy, jejichž průměr odpovídal 4 mm, a zjišťoval se obsah volného lyzinu a treoninu a aktivita AK a DHPS.

Příklad 3: Analýza obsahu volného lyzinu, treoninu a metioninu v transgenních rostlinách brambor.

Tkáň (0,5 až 1,0 gramu) se homogenizovala v misce tloučkem ve 2 ml 50 mM Pi-pufri (pH 7,0), který obsahuje 1mM ditiotreitol. Leucin jako vnitřní standard se nepřidal. Volné aminokyseliny se částečně čistily extrakcí s 5 ml směsí voda:chloroform:metanol (3:5:12). Sebrala se vodní fáze a zbytek se dvakrát re-extrahoval. Po zakoncentrování lyofilizací na objem 3 ml se použilo 20  $\mu$ l vzorku při 6-aminochinoly-A-hydroxysukcinimidylkarbamatové (AQC) derivatizační reakci. Derivatizované aminokyseliny se



analyzovaly pomocí DHPS na koloně C18 s reverzními fázemi podle instrukcí výrobce (systém Waters AccQ.Tag).

Příklad 4: Analýza aktivity AK v transgenních rostlinách brambor.

Sklidily se mikrohlízy, listy nebo dozrálé hlízy a homogenizovaly se v misce tloučkem ve stejném objemu chladného 20 mM pufru fosforečnanu draselného pH 7,0, který obsahuje 30 mM  $\beta$ -merkaptoetanol, 0,1 mM L-lyzin, 0,1 mM L-treonin, 1 mM fenylmetylsulfonylfluorid a 0,5 ug/ml leupeptinu. Následuje 5 minut centrifugace (16 000 g, při teplotě 4 °C). Sebral se supernatant a stanovila se v něm koncentrace proteinu. Ve stejném množství proteinu se testovala aktivita AK, jak se popisuje v publikaci Black, S. et al. (1955) J. Biol. Chem. 213: 27-38. Testovaná směs (konečný objem 0,25 ml) obsahovala 300 ug proteinu, 100 mM tris-HCl, pH 8,0, 200 mM, NH<sub>2</sub>OH, který se před použitím neutralizoval KOH, 10 mM ATPm, 5mM MgCl<sub>2</sub> a 30 mM L-aspartát. Kontrolní test obsahoval všechny ingredience mimo L-aspartátu. Reakce proběhly při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny a pak se ukončily přidáním 0,25 ml roztoku 1:1:1 10% (hmotnost/objem) FeCl<sub>3</sub> v 0,1 N HCl, 3N HCl a 12% TCA, který se smísil těsně před použitím. Reakční směs se nechá stát 5 minut na ledu a centrifuguje se (po dobu 5 minut, při 16 000 g, při teplotě 4 °C) a stanoví se absorbance světla supernatantu při vlnové délce 490 nm. V případě každého vzorku se nespecifická aktivita získaná za nepřítomnosti L-aspartátu odečetla z hodnoty získané v přítomnosti L-aspartáru.

Příklad 5: Analýza aktivity DHPS v transgenních hlízách brambor.

Mikrohlízy a zralé hlízy se homogenizovaly v misce tloučkem v ekvivalentním objemu chladného 100 mM Tris-HCl pH 7,5, který obsahuje 2 mM EDTA, 1,4 % askorbát sodný, 1 mM fenylmetylsulfonylfluorid a 0,5 ug/ml leupeptinu. Následuje 5

minut centrifugace (16 000 g při teplotě 4 °C) a shromáždil se supernatant. Aktivita DHPS se měřila za použití 0-aminobenzaldehydového (0-ABA) způsobu popsaného v publikaci Yugari, Aby and Gilvarg, C. (1965) J. Biol. Chem. 240: 4710-4716.

**Příklad 6: Příprava konstrukce dvou genů pro transformaci cukrové řepy přímým transferem genů.**

Za účelem zavedení chimerní konstrukce do cukrové řepy se chimerní geny začlenily do plazmidového vektoru, který je specifický pro přímou transformaci genů do cukrové řepy. Plazmid pPG5 (popisuje se v publikaci Hall, R.D. et al., (1996), Nature Biotechnol. 14: 1133-1138) obsahující gen *pat*, který kóduje fosfinotricinacetyltransferázu, se štěpil restriční enzymem HindIII, vyplnil se a dále se štěpil restriční enzymem SacI. Binární vektor pAAP50 (obrázek č. 2B) se štěpil restriční enzymem XbaI, vyplnil se a dále se štěpil restriční enzymem SacI. Izoloval se fragment SacI s tupým koncem, jenž obsahuje konstrukci, a ligoval se do fragmentu SacI plazmidu pPG5 s tupými konci (pAAP60; obrázek č. 2D).

**Příklad 7: Zavedení chimerních genů do rostlin cukrové řepy.** Při transformaci podle protokolu popsaném v publikaci Hall, R.D. et al., (1996), Nature Biotechnol. 14: 1133-1138 se použily kultury výhonků šlechtitelské linie diploidní cukrové řepy (Bv-NF, Hall, R.D. et al (1993) Plant CellRep. 12: 339-342). Podle uvedeného protokolu se používá způsob transferu DNA zprostředkovaný polyetylen glykolem, který se aplikuje na populace protoplastů specificky obohacených typem buněk získaných z buněk stomatu. Stabilně transformované buňky se selektovaly na médiu doplněném 200 ul/ml bialafosu po dobu 4 týdnů. Kali rezistentní na bialafos se následně subkultivovaly na médiu, které neslouží k selekci, a po

regeneraci výhonků a pupenů se rostliny daly do půdy a přenesly se do skleníku.

Příklad 8: Analýza volného lyzinu, treoninu a metioninu v transgenních rostlinách cukrové řepy.

Ve tkáni listů a kořenů transgenních rostlin cukrové řepy se analyzovalo množství volných aminokyselin podle protokolu popsaného shora v textu v příkladu 3.

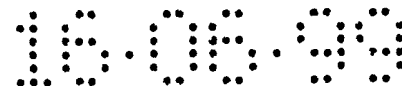
70 1746-99  
18.05.99  
43424

## P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Chimerní konstrukce dvou genů, která po zavedení do rostlinné buňky je schopna produkovat alespoň dvě aminokyseliny dráhou aspartátové rodiny, zvláště to jsou lysin a threonin a/nebo methionin, přičemž uvedená konstrukce zahrnuje:

- (a) sekvenci nukleové kyseliny kódující enzym vykazující aktivitu aspartátové kinázy (AK),
- (b) sekvenci nukleové kyseliny kódující enzym vykazující aktivitu dihydropikolinátové syntázy (DHPS),
- (c) sekvenci regulující expresi kódující sekvence (a), která je operabilně spojena s (a),
- (d) sekvenci regulující expresi kódující sekvence (b), která je operabilně spojena s (b),
- (e) sekvenci nukleové kyseliny kódující chloroplastový tranzitní peptid, který se podílí na translokaci produktu exprese a),
- (f) sekvence nukleové kyseliny kódující chloroplastový tranzitní peptid, který je zahrnut do translokace produktu exprese b),
- (g) sekvenci nukleové kyseliny poskytující terminační signál transkripce DNA v případě transkripce (a),
- (h) sekvenci nukleové kyseliny poskytující terminační signál transkripce DNA v případě transkripce (b),

přičemž expresi regulující sekvence (c) a (d) jsou takové, že exprese sekvence (a) kódující AK se objevuje ve větším rozsahu, než je exprese sekvence (b) kódující DHPS, dále sekvence (c) a (d) regulují expresi sekvence (b) v pozdějším stádiu vývoje rostliny, než dochází k expresi sekvence (a) a/nebo sekvence (c) obsahuje promotorovou sekvenci, která umožňuje expresi ve všech rostlinných

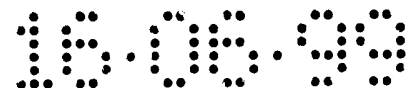


buňkách nebo rostlinných orgánech a sekvence (d) obsahuje promotorovou sekvenci, jenž je specifická pro orgány.

2. Genová konstrukce podle nároku 1, kde sekvence (d) umožňuje expresi v jednom nebo více rostlinných orgánů bohatých na vodu, přičemž je to například hlíza, květ, stonek, plod, kořen nebo list.
3. Genová konstrukce podle nároku 2, kde sekvence (d) obsahuje patatinový promotor třídy I specifický pro hlízu, jenž pochází z *Solanum tuberosum*, promotor proteinázového inhibitoru II z brambor, promotor inhibitoru kathepsinu D z brambor nebo pro plody specifický promotor pocházející z genu polygalakturonidázy rajčete.
4. Genová konstrukce podle libovolného z předchozích nároků 1 až 3, kde sekvence (c) obsahuje promotor a sekvenci zesilující expresi, jako je sekvence omega získaná z genu obalového proteinu tabákového mozaikového viru nebo zesilovač translace alfalfa mozaikového viru a kde sekvence (c) a (d) mohou obsahovat stejný promotor.
5. Genová konstrukce podle libovolného z předchozích nároků 1 až 3, kde sekvence (c) obsahuje konstitutivní promotor, zvláště promotor 35S květákového mozaikového viru (CaMV).
6. Genová konstrukce podle libovolného z nároků 1 až 4, kde sekvence (c) a (d) obsahují indukovatelné promotory a kde stimul indukce se v případě dvou promotorů liší.
7. Genová konstrukce podle nároku 6, kde indukovatelné promotory se vybraly ze světlem indukovatelných promotorů.

8. Genová konstrukce podle libovolného z předchozích nároků, kde sekvence (e) je sekvence nukleové kyseliny získaná z genu feredoxinu kódujícího cílení proteinů do chloroplastového stroma, sekvence z genu plastocyaninu kódující cílení proteinů do chloroplastového lumenu nebo se preferuje sekvence tranzitního peptidu, která pochází z genu hrachu rbcS-3A.
9. Genová konstrukce podle libovolného z předchozích nároků, kde kódující sekvence (a) a (b) fúzovaly s terminačním signálem transkripce DNA (g) respektive (h), přičemž terminační signály (g) a (h) obsahují signál ukončení 3' transkripce a signál polyadenylace mRNA.
10. Genová konstrukce podle libovolného z předchozích nároků, kde sekvence (g) a/nebo (h) obsahuje terminační signály, které se nacházejí v 3' lemuující oblasti genu hrachu rbcS, genu faseolinu fazole, genu nopalinové syntázy získané z plazmidu Ti *Agrobacterium tumefaciens* nebo s výhodou genu oktopinové syntázy pocházejícího z plazmidu Ti A. *tumefaciens*.
11. Genová konstrukce podle libovolného z předchozích nároků, kde sekvence (a) kóduje enzym, který je méně citlivý k inhibici lysinem a sekvence (b) kóduje enzym, který je méně náchylný k inhibici threoninem, ve srovnání s odpovídajícími rostlinnými enzymy divokého typu.
12. Genová konstrukce podle libovolného z předchozích nároků, kde sekvence nukleové kyseliny (a) a (b) se získaly z bakterií, kde zvláště (a) je mutantního gen LysC z *E. coli* kódující izoenzym AK-III a (b) je gen dapA z *E. coli*.

13. Genová konstrukce podle libovolného z nároků 1 až 11, kde kódující sekvence nukleové kyseliny (a) a/nebo (b) kóduje mutovaný rostlinný enzym, který je méně citlivý ke zpětnovazebné inhibici.
14. Expresivní vektor, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje chimerní konstrukci dvou genů podle libovolného z předchozích nároků.
15. Transgenní rostlina, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje konstrukci dvou genů podle libovolného z nároků 1 až 13 nebo obsahuje expresivní vektor podle nároku 14.
16. Transgenní rostlina podle nároku 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e je schopna předávat uvedenou konstrukci dvou genů nebo její elementy potomstvu rostliny.
17. Transgenní rostlina podle nároku 15 nebo 16, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e vykazuje schopnost produkovat threonin a lysin v množství více jak pětikrát vyšším než je produkce rostliny divokého typu za stejných kultivačních podmínek, upřednostňuje se, aby produkce byla více jak sedmkrát vyšší.
18. Transgenní rostlina podle libovolného z nároků 15 až 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e vykazuje schopnost produkovat methionin v množství, které převyšuje produkci rostliny divokého typu za stejných kultivačních podmínek.
19. Transgenní rostlina podle libovolného z nároků 15 až 18, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e v orgánu bohatém na vodu, zvláště v hlíze, stonku, plodu, kořenu, květu nebo

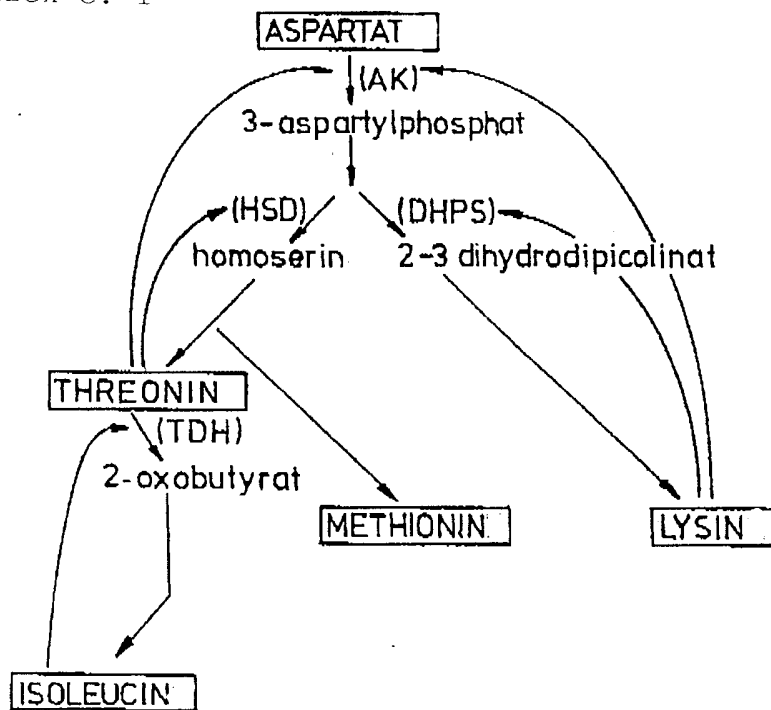


listu ve srovnání s rostlinnou divokého typu za stejných kultivačních podmínek se nadměrně produkuje threonin a lysin.

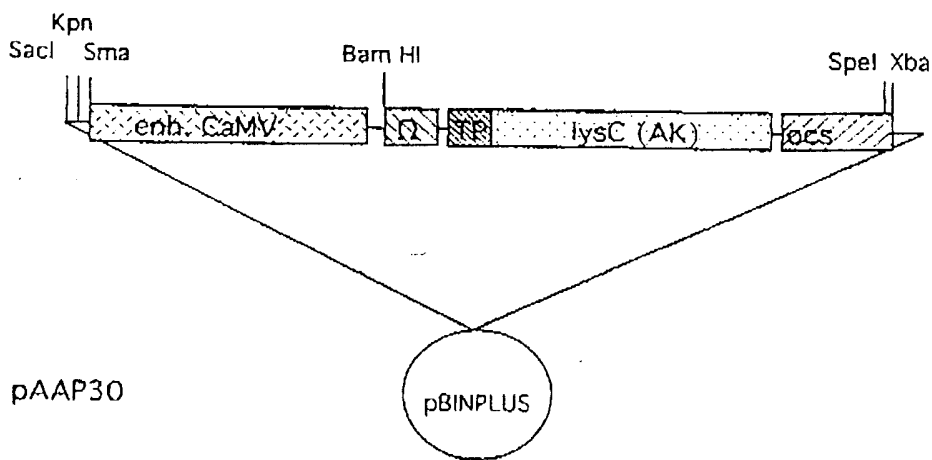
20. Transgenní rostlina podle nároku 19, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsah vody uvedené hlízy, květu, stonku, kořene, plodu rostliny je za normálních kultivačních podmínek rostliny, která není transgenní, alespoň 80 %.
21. Transgenní rostlina podle libovolného z nároků 15 až 20, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se vybrala ze skupiny zahrnující rostliny brambor, cukrové řepy nebo tráviny.
22. Část rostliny podle libovolného z nároků 15 až 21, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje alespoň buňku.
23. Část podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se získala z hlízy, plodu, kořene, stonku, semene nebo květu nebo je hlízou, plodem, stonkem, semenem, květem nebo listem.
24. Vodní frakce, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e je získatelná extrakcí z rostliny podle libovolného z nároků 15 až 21 nebo z části podle nároku 22 nebo 23.
25. Způsob získání rostliny schopné nadměrně produkovat alespoň lysin a threonin, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje:
  - zavedení konstrukce dvou genů podle libovolného z nároků 1 až 13 nebo jejich elementů (a) až (h) nebo vektoru podle

- nároku 14 způsobem, který je znám pro zavedení sekvencí nukleové kyseliny do rostlinné buňky,
- následuje kultivace rostlinné buňky na tkáň nebo na část rostliny nebo na zralou rostlinu za podmínek, kdy jsou aktivovány regulační sekvence (c) a (d).
26. Způsob podle nároku 25, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e genová konstrukce se zavedla do rostlinné buňky transformací.
27. Způsob podle nároku 25, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se kříží dvě rostliny obsahující sub-fragmenty uvedené genové konstrukce.
28. Způsob podle libovolného z nároků 25 až 27, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje selekci části rostliny nebo získané tkáně a růst rostliny z této tkáně nebo z tkáně nebo orgánů získaných z uvedené rostliny.

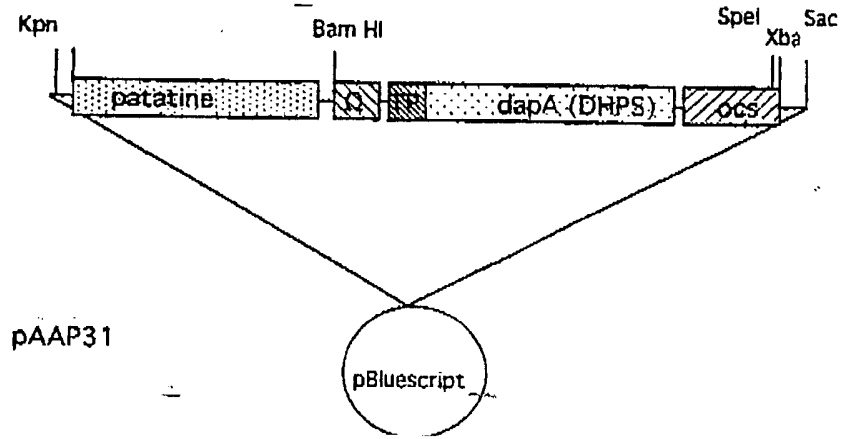
Obrázek č. 1



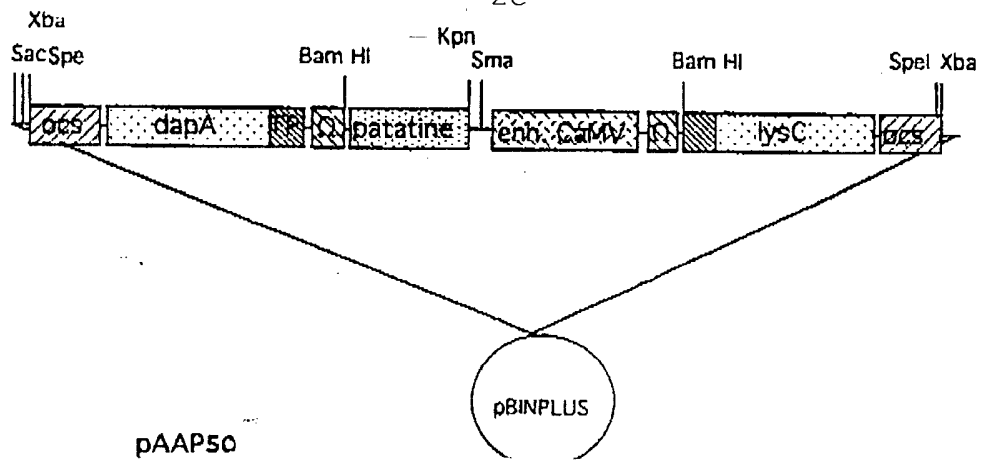
Obrázek č. 2a



Obrázek č. 2b



Obrázek č. 2c



Obrázek č. 2d

