



(11) **121968 B1**

(51) Int.Cl.

C12N 15/54 (2006.01);
C12N 15/82 (2006.01);
C12N 15/70 (2006.01);
C12N 15/11 (2006.01);
C12N 9/10 (2006.01);
A01H 5/00 (2006.01)

(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **99-01306**

(22) Data de depozit: **10.06.1998**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.09.2008** BOPI nr. 9/2008

(30) Prioritate:
12.06.1997 US 60/049,471

(86) Cerere internațională PCT:
Nr. **US 98/11893 10.06.1998**

(87) Publicare internațională:
Nr. **WO 98/56923 17.12.1998**

(73) Titular:
• **NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY,**
103 BYNUM HALL, CAMPUS BOX 7003, NC
27695-7003, RALEIGH, US

(72) Inventatori:

• **CONKLING MARK A., 5313 APRIL WIND**
DRIVE, NC 27707, FUQUAY-VARINA, US;
• **MENDU NANDINI, 5639 CHAPEL HILL**
ROAD 207, NC 27709, DURHAM, US;
• **SONG WEN, 9616 GOLD COAST DRIVE,**
NO. G-8, CA 92126, SAN DIEGO, US

(74) Mandatar:

ROMINVENT S.A.,
STR. ERMIL PANGRATTI, NR. 35,
SECTOR 1, BUCUREȘTI

(56) Documente din stadiul tehnicii:
WO 9305646, WO 9428142

(54) REGLAREA EXPRIMĂRII CHINOLAT FOSFORIBOZIL TRANSFERAZEI

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o moleculă izolată ADN, care codifică o enzimă chinolat fosforibozil transferază vegetală, precum și la construcții care cuprind molecula de ADN menționată. Invenția se mai referă la procedee de modificare a expresiei chinolat fosforibozil transferazei.

Revendicări: 46
Figuri: 6

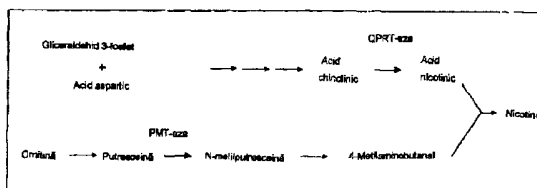


Fig. 1



RO 121968 B1

1 Această invenție se referă la chinolat fosforibozil transferaza vegetală (QPRT-aza)
și la ADN-ul care codifică această enzimă. În particular, această invenție se referă la uti-
3 lizarea ADN-ului care codifică chinolat fosforibozil transferaza în scopul obținerii de plante
transgenice având nivele de nicotină modificate genetic, și la plantele astfel obținute.

5 Datorită unor considerente legate de natura vicioasă (generatoare de dependență)
a nicotinei, producerea unui tutun cu un conținut redus de nicotină prezintă un deosebit in-
7 teres. În plus, plantele de tutun cu nivele extrem de scăzute ale producerii de nicotină, sau
fără producere de nicotină, sunt atractive ca primitori pentru transgenele care exprimă pro-
9 duse cu valoare comercială, cum ar fi: produsele farmaceutice, componentele cosmetice,
sau aditivii alimentari. Pentru îndepărtarea nicotinei din tutun au fost concepute diverse pro-
11 cedee. Cu toate acestea, cea mai mare parte a acestor procedee îndepărtează și alte in-
grediente din tutun, în afara nicotinei, prin aceasta fiind afectat tutunul. Prin tehnicile clasice
13 de regenerare a plantelor s-au obținut plante de tutun cu conținuturi mai scăzute de nicotină
(aproximativ 8%) față de cele care se găsesc în plantele de tutun de tip sălbatic. Sunt de do-
15 rit plante de tutun și tutun având reduceri suplimentare ale conținutului de nicotină.

O abordare în scopul reducerii nivelului unui produs biologic este aceea de a reduce
17 cantitatea unei enzime necesare din calea de biosinteză care duce la acel produs. Dacă
enzima afectată se găsește, în mod natural, într-o cantitate limitativă de viteză (față de alte
19 enzime necesare din calea de biosinteză), orice diminuare a abundenței acestei enzime va
conduce la scăderea producerii produsului final. Dacă cantitatea enzimei nu este, în mod
21 normal, limitativă de viteză, prezența sa într-o celulă trebuie să fie redusă la nivele limitative
de viteză, în scopul diminuării randamentului căii. În schimb, dacă cantitatea de enzimă exis-
23 tentă în mod natural este limitativă de viteză, atunci orice creștere a activității enzimatice va
avea ca rezultat o creștere a produsului final al căii de biosinteză.

25 În principiu, nicotina se formează în rădăcinile plantei de tutun și este transportată
ulterior spre frunze, unde este depozitată (Tso, *Physiology and Biochemistry of Tobacco*
27 *Plants*, pp. 233 - 234, Dowden, Hutchinson & Ross, Stroudsburg, Pa (1972)). O etapă
obligatorie în biosinteza nicotinei este formarea acidului nicotinic din acid chinolinic, etapă
29 care este catalizată de enzima chinolin fosforibozil transferaza (QPRT-aza). QPRT-aza pare
să fie o enzimă limitativă de viteză din calea de alimentare cu acid nicotinic pentru sinteza
31 nicotinei în tutun. A se vedea, spre exemplu: Feth și colab., "Regulation in Tobacco Callus
of Enzyme Activities of the Nicotine Pathway", *Planta*, 168, pp. 402 - 407 (1986); Wagner și
33 colab., "The Regulation of Enzyme Activities of the Nicotine Pathway in Tobacco", *Physiol.*
Plant, 68, pp. 667 - 672 (1986). Modificarea conținutului de nicotină din plantele de tutun prin
35 reglarea antisens a expresiei metil transferazei de putrefacție (PMT-aza) a fost propusă în
brevetele **US5369023** și **US5260205** de către Nakatani și Malik. Cererea **PCT WO 94/28142**
37 a lui Wahad și Malik descrie ADN-ul care codifică PMT și utilizarea construcțiilor PMT sens
și antisens.

39 Invenția se referă la o moleculă izolată de ADN care cuprinde o secvență selecționată
din grupul de secvențe alcătuit din:

- 41 - secvența SECV. ID Nr.:1;
- secvențe de ADN care codifică o enzimă având secvența de aminoacizi din
- 43 SECV. ID Nr.:2;
- secvențe de ADN care au cel puțin omologie de 65% cu ADN-ul izolat de la punctele
- 45 a) și b) și care codifică pentru o enzimă chinolat fosforibozil transferaza; și
- secvențe de ADN care diferă de secvențele ADN de la punctele a), b) sau c) de mai
- 47 sus, datorită degenerării codului genetic și care codifică pentru o enzimă chinolat fosforibozil
transferaza.

RO 121968 B1

Invenția se mai referă la un construct ADN, care cuprinde, în direcția 5'-3' un promotor funcțional într-o celulă vegetală și o secvență de ADN cuprinzând o secvență codificatoare a chinolat fosforibozil transferazei de tipul celei menționate anterior, poziționată în aval față de promotor și asociată funcțional cu acesta.	1 3
Într-o altă variantă a invenției, constructul ADN cuprinde în direcția 5'-3' un promotor vegetal și o secvență de ADN cuprinzând o secvență codificatoare a chinolat fosforibozil transferazei de tipul celei menționate anterior, poziționată în aval față de promotor și asociată funcțional cu acesta, secvența ADN respectivă fiind în orientare antisens.	5 7
Un obiect al invenției îl reprezintă o celulă de plantă care cuprinde unul din constructele ADN menționate anterior.	9
Un alt obiect al invenției îl constituie o plantă transgenică care cuprinde celulele de plante amintite.	11
De asemenea, invenția se referă la o peptidă care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID Nr.: 2.	13
Invenția se mai referă la un procedeu de obținere a unei celule vegetale transgenice cu o expresie diminuată a chinolat fosforibozil transferazei care cuprinde:	15
- furnizarea unei celule de plantă de un tip cunoscut care să exprime chinolat fosforibozil transferaza,	17
- furnizarea unui construct ADN exogen, care cuprinde, în direcția 5'-3' un promotor funcțional într-o celulă vegetală și o secvență heteroloagă de ADN care conține o porțiune a secvenței care codifică ARNm al chinolat fosforibozil transferazei și este selectat din secvențele ADN definite anterior, secvența heteroloagă de ADN fiind asociată funcțional cu promotorul, și	19 21 23
- transformarea celulei vegetale respective cu constructul ADN menționat, pentru a produce celule transformate, celula vegetală transformată amintită având o expresie diminuată a QPRT-azei comparativ cu o celulă de plantă netransformată, și ADN-ul heterolog cuprinzând cel puțin 25 de nucleotide din secvența de ADN definită anterior.	25 27
Un alt obiect al invenției este o plantă transgenică din genul <i>Nicotiana</i> având diminuată expresia chinolat fosforibozil transferazei comparativ cu o plantă de control netransformată, care cuprinde celule de plantă transgenică care conțin:	29
- un construct ADN exogen care cuprinde, în direcția 5'-3', un promotor funcțional în celula vegetală menționată și o secvență ADN heteroloagă care cuprinde un segment al unei secvențe ADN ce codifică un ARNm al chinolat fosforibozil transferazei vegetale, selectat din secvențele ADN amintite, ADN-ul respectiv fiind asociat funcțional cu promotorul;	31 33
- planta prezentând o expresie redusă a chinolat fosforibozil transferazei comparativ cu o plantă martor netransformată, și ADN-ul heterolog cuprinzând cel puțin 25 de nucleotide ale unei secvențe ADN de tipul celei menționate.	35 37
Invenția se referă și la un descendent al plantei transgenice amintite.	
Un obiect al invenției îl reprezintă și un procedeu de reducere a expresiei genei pentru chinolat fosforibozil transferaza într-o celulă vegetală, care cuprinde:	39
- creșterea unei celule vegetale transformate să conțină o secvență heteroloagă de ADN selectată din secvențele ADN menționate mai sus, în care o catenă transcrisă a respectivei secvențe heteroloage de ADN este complementară cu ARNm pentru chinolat fosforibozil transferaza endogen la celula menționată, în care transcrierea respectivei catene complementare reduce expresia genei chinolat fosforibozil transferazei.	41 43 45
Invenția se mai referă la un procedeu de obținere a unei plante de tutun cu nivele scăzute de nicotină în frunze care cuprinde:	47

RO 121968 B1

1 - creșterea unei plante de tutun sau a unui descendent al acesteia, în care respectiva
2 plantă cuprinde celulele conținând un construct ADN exogen, cuprinzând o regiune de
3 inițiere a transcrierii, funcțională în planta menționată și o secvență de ADN heteroloagă, se-
4 lectată din secvențele ADN conform invenției, legate funcțional la regiunea de inițiere a
5 transcrierii, în care catena transcrisă a secvenței heteroloage de ADN menționată este
6 complementară cu ARNm endogen pentru chinolat fosforibozil transferază în celulele res-
7 pective.

8 De asemenea, invenția se mai referă la un procedeu de obținere a unei celule de
9 plantă transgenică cu nivel crescut al expresiei chinolat fosforibozil transferazei, care
10 cuprinde:

11 - furnizarea unei celule de plantă de un tip cunoscut pentru a exprima chinolat
12 fosforibozil transferaza,

13 - furnizarea unui construct ADN exogen, care să conțină, în direcția 5'-3', un promotor
14 funcțional într-o celulă vegetală și o secvență ADN heteroloagă care codifică pentru chinolat
15 fosforibozil transferaza și este selectată din secvențele ADN conform invenției, secvența de
16 ADN heteroloagă fiind asociată funcțional cu promotorul;

17 - transformarea celulei vegetale respective cu constructul de ADN menționat pentru
18 a produce o celulă vegetală transformată, celula vegetală transformată având o expresie
19 crescută a chinolat fosforibozil transferazei comparativ cu o celulă vegetală netransformată.

20 Un obiect al invenției îl reprezintă și o plantă transgenică din genul *Nicotiana* având
21 o expresie crescută a chinolat fosforibozil transferazei comparativ cu o plantă martor ne-
22 transformată care cuprinde celule de plantă transgenică care conțin:

23 - un construct ADN exogen care cuprinde, în direcția 5'-3', un promotor funcțional în
24 celula vegetală amintită și o secvență ADN heteroloagă care codifică o chinolat fosforibozil
25 transferază vegetală selectată dintre secvențele ADN conform invenției, ADN-ul heterolog
26 fiind funcțional asociat cu promotorul;

27 - planta având o expresie crescută a chinolat fosforibozil transferazei și, prin urmare,
28 nivele crescute de nicotină în frunze, față de o plantă martor netransformată, precum și
29 descendenți ai acesteia.

30 Invenția se mai referă la un procedeu pentru creșterea expresiei genei chinolat
31 fosforibozil transferazei într-o celulă de plantă care cuprinde:

32 - creșterea unei celulele vegetale transformată pentru a conține un ADN exogen se-
33 lectat dintre secvențele de ADN conform invenției, în care ADN-ul exogen codifică pentru
34 chinolat fosforibozil transferază.

35 Un alt obiect al invenției îl reprezintă un procedeu de obținere a unei plante de tutun
36 cu nivele crescute de nicotină în frunze care cuprinde:

37 - creșterea unei plante de tutun sau a unui descendent al acesteia, în care planta
38 menționată cuprinde celule conținând un construct ADN exogen cuprinzând o transcriere
39 funcțională a regiunii de inițiere în planta amintită și o secvență heteroloagă de ADN,
40 selectată dintre secvențele ADN conform invenției, legate funcțional la regiunea de inițiere
41 a transcrierii menționată, în care numita secvență heteroloagă de ADN codifică pentru
42 chinolat fosforibozil transferaza funcțională în celulele respective.

43 Invenția se mai referă și la utilizările celulelor de plantă de tutun conform invenției,
44 pentru fabricarea unui produs de tutun cu un conținut modificat de nicotină.

45 Un prim aspect al prezentei invenții îl constituie o moleculă de ADN izolată conținând:
46 SECV ID NR: 1; secvențe de ADN care codifică o enzimă având SECV ID NR: 2; secvențe
47 de ADN care hibridizează cu un astfel de ADN și care codifică o enzimă - chinolat fosforibozil

RO 121968 B1

transferaza; și secvențe de ADN care diferă de ADN-ul de mai sus datorită degenerării codului genetic. O peptidă codificată de un asemenea ADN reprezintă un alt aspect al acestei invenții.	1 3
Un alt aspect al prezentei invenții îl reprezintă un construct ADN conținând un promotor operabil într-o celulă vegetală și un segment de ADN care codifică o enzimă - chinolat fosforibozil transferaza, poziționat în aval de promotor și asociat în mod operativ cu acesta. ADN-ul care codifică enzima poate fi în direcția antisens sau sens.	5 7
Un alt aspect al prezentei invenții îl reprezintă un procedeu de obținere a unei celule vegetale transgenice cu o expresie redusă a chinolat fosforibozil transferazei (QPRT-azei), prin furnizarea unei celule vegetale de un tip cunoscut cu capacitatea de a exprima chinolat fosforibozil transferaza; transformarea celulei vegetale cu un construct de ADN exogen conținând un promotor, și ADN-ul conținând o porțiune dintr-o secvență care codifică ARNm-ul pentru chinolat fosforibozil transferaza.	9 11 13
Încă un aspect al prezentei invenții îl reprezintă o plantă transgenică din specia <i>Nicotiana</i> având o expresie redusă a chinolat fosforibozil transferazei (QPRT-azei), comparativ cu o plantă martor netransformată. Celulele unor asemenea plante conțin un construct de ADN care include un segment dintr-o secvență de ADN care codifică un ARNm corespunzător chinolat fosforibozil transferazei (QPRT-azei) vegetale.	15 17
Un alt aspect al prezentei invenții îl reprezintă un procedeu pentru reducerea exprimării unei gene pentru chinolat fosforibozil transferaza într-o celulă vegetală, prin cultivarea unei celule vegetale transformate în sensul de a conține ADN-ul exogen, în care o catenă transcrisă a acestui ADN exogen este complementară ARNm-ului endogen, din celulă, corespunzător chinolat fosforibozil transferazei. Transcrierea catenei complementare reduce exprimarea genei endogene pentru chinolat fosforibozil transferază.	19 21 23
Încă un aspect al prezentei invenții este dat de un procedeu de obținere a unei plante de tutun cu cantități reduse de nicotină în frunzele plantei de tutun, prin cultivarea unei plante de tutun cu celule care conțin o secvență dintr-un ADN exogen, în care o catenă transcrisă a secvenței de ADN exogen este complementară cu ARNm-ul endogen corespunzător chinolat fosforibozil transferazei din celule.	25 27 29
Încă un aspect al prezentei invenții îl constituie un procedeu de obținere a unei celule vegetale transgenice cu o expresie crescută a chinolat fosforibozil transferazei (QPRT-azei), prin transformarea unei celule vegetale cunoscută drept producătoare de chinolat fosforibozil transferaza cu un construct de ADN exogen conținând o secvență de ADN care codifică chinolat fosforibozil transferaza.	31 33
Un alt aspect al prezentei invenții este reprezentat de o plantă de <i>Nicotiana</i> transgenică, având o exprimare (producere) sporită a chinolat fosforibozil transferazei (QPRT-azei), în care celulele plantei transgenice conțin o secvență de ADN exogen care codifică o chinolat fosforibozil transferaza vegetală.	35 37
Un alt aspect al prezentei invenții îl constituie un procedeu de creștere a expresiei unei gene pentru chinolat fosforibozil transferaza într-o celulă vegetală, prin cultivarea unei celule vegetale transformate în sensul de a conține ADN-ul exogen care codifică chinolat fosforibozil transferaza.	39 41
Încă un aspect al prezentei invenții îl reprezintă un procedeu de obținere a unei plante de tutun având cantități ridicate de nicotină în frunze, prin cultivarea unei plante de tutun cu celule care conțin o secvență de ADN exogen care codifică chinolat fosforibozil transferaza funcțională în celule.	43 45
<i>Figuri:</i>	47
- fig.1 reprezintă calea de biosinteză care conduce la nicotină. Activitățile enzimatice cunoscute ca fiind reglate de genele <i>Nic1</i> și <i>Nic2</i> sunt QPRT-aza (chinolat fosforibozil transferaza) și PMT-aza (metil transferaza de putrefacție).	49

RO 121968 B1

1 - fig.2A furnizează secvența de acid nucleic a cADN-ului *NtQPT1* (SECV ID NR:1), împreună cu secvența codificatoare (SECV ID NR:3) reprezentate prin majuscule.

3 - fig.2B redă secvența dedusă a aminoacidului (SECV ID NR:2) corespunzător QPRT-azei din tutun, codificat de către gena cADN *NtQPT1*.

5 - fig.3 aliniaza secvența dedusă de aminoacid a *NtQPT1* și secvențele asemănătoare din *Rhodospirillum rubrum*, *Mycobacterium lepre*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, umane, și *Saccharomyces cerevisiae*.

7 - fig.4 prezintă rezultatele complementarizării unui mutant de *Escherichia coli* căruia îi lipsește chinolat fosforibozil transferaza (TH265), cu gena cADN *NtQPT1*. Celulele au fost transformate cu un vector de expresie purtător al genei *NtQPT1*; cultivarea celulelor transformate TH265 care exprimă gena *NtQPT1*, pe mediu minimal lipsit de acid nicotinic, a demonstrat că gena *NtQPT1* codifică QPRT-aza.

13 - fig.5 compară nivelele de nicotină și nivelele relative staționare ale ARNm-ului corespunzător genei *NtQPT1* în mutantele de tutun: tipul sălbatic Burley 21 (*Nic1/Nic1 Nic2/Nic2*); *Nic1*- Burley 21 (*nic1/nic 1 Nic2/Nic2*); *Nic2*- Burley 21 (*Nic1/Nic1 nic2/nic2*) și Burley 21 *Nic1*⁻ și *Nic2*⁻ (*nic1/nic1 nic2/nic2*). Barele solide indică nivelele transcriptului ARNm; barele hașurate indică cantitățile de nicotină.

19 - fig.6 reprezintă grafic nivelele relative ale ARNm-ului corespunzător genei *NtQPT1*, în timp, în plantele de tutun superioare, comparativ cu plantele martor neperformante. Barele solide indică nivelele transcriptului ARNm; barele hașurate indică nivelele de nicotină.

21 Nicotina este produsă în plantele de tutun prin condensarea acidului nicotinic cu 4-metilaminobutanal. Calea de biosinteză care conduce la producerea nicotinei este ilustrată în fig. 1. Două locusuri reglatoare (*Nic1* și *Nic2*) acționează ca reglatori co-dominanți ai producerii nicotinei. Analizele enzimatice ale rădăcinilor de la mutantele mono și dublu *Nic* arată că activitățile celor două enzime: chinolat fosforibozil transferaza (QPRT-aza) și metil transferază de putrefacție (PMT-aza), sunt direct proporționale cu nivelele de biosinteză a nicotinei. O comparație a activității enzimatice din țesuturile plantei de tutun (rădăcină și calus) cu diferite capacități de sinteză a nicotinei arată că activitatea QPRT-azei este strict corelată cu conținutul în nicotină (Wagner and Wagner, *Planta* 165:532 (1985)). Saunders și Bush (*Plant Physiol.* 64:236 (1979) au arătat că nivelul QPRT-azei din rădăcinile mutantelor cu conținuturi scăzute de nicotină este proporțional cu nivelele de nicotină din frunze.

33 Prezenta invenție cuprinde o nouă secvență a unui cADN (SECV ID NR:1) care codifică o chinolat fosforibozil transferază (QPRT-ază) vegetală având SECV ID NR:2. Cum activitatea QPRT-azei este strâns corelată cu conținutul de nicotină, construirea de plante transgenice de tutun în care nivelele QPRT-azei să fie scăzute în rădăcinile plantei (comparativ cu nivelele din plantele de tip sălbatic) duce la plante cu nivele reduse de nicotină în frunze. Prezenta invenție furnizează metode și structuri de acid nucleic pentru producerea unor asemenea plante transgenice, ca și astfel de plante transgenice. Asemenea metode includ exprimarea ARN-ului antisens pentru gena *NtQPT1*, prin aceasta reducându-se cantitatea de QPRT-ază din rădăcinile de tutun. Nicotina a mai fost descoperită și în alte specii și familii de plante decât tutunul, deși cantitatea prezentă este, de obicei, mult mai scăzută decât în *Nicotiana tabacum*.

45 Prezenta invenție mai prevede și molecule de ADN recombinant sens și antisens care codifică QPRT-aza sau molecule antisens de ARN corespunzător QPRT-azei, și vectori conținând acele molecule de ADN recombinant; precum și celule vegetale transgenice și plante transformate cu acele molecule de ADN și vectori. Celulele și plantele de tutun transgenice din prezenta invenție sunt caracterizate printr-un conținut mai scăzut sau mai ridicat de nicotină față de celulele și plantele de tutun martor, netransformate.

RO 121968 B1

Plantele de tutun cu niveluri extrem de scăzute ale producerii de nicotină, sau fără producere de nicotină, sunt atractive ca primitori pentru transgenele care exprimă produse valoroase din punct de vedere comercial cum ar fi: produsele farmaceutice, componentele cosmetice sau aditivii alimentari. Tutunul este atractiv ca plantă gazdă pentru o transgenă care codifică un produs dorit, deoarece este ușor de manipulat prin inginerie genetică și produce o cantitate foarte mare de biomasă per acru; plantele de tutun cu resurse scăzute destinate producerii de nicotină vor avea, în consecință, resurse suplimentare disponibile pentru producerea de produse transgenice. Sunt cunoscute în domeniu metode de transformare a tutunului cu transgene producătoare de produse dorite; orice tehnică adecvată poate fi utilizată în cazul plantelor de tutun având un conținut scăzut de nicotină, din această invenție.

Plantele de tutun conforme prezentei invenții, cu o expresie redusă a QPRT-azei și cu niveluri scăzute de nicotină, vor fi de dorit în obținerea de produse pe bază de tutun având un conținut redus de nicotină. Plantele de tutun conforme prezentei invenții vor fi adecvate utilizării în orice produs tradițional pe bază de tutun, incluzând, dar nelimitându-se la pipă, țigară sau tutun de țigaretă și la tutunul de mestecat, ci pot fi sub orice formă, inclusiv frunze de tutun, tutun tocat sau tutun tăiat.

Constructele din prezenta invenție pot fi, de asemenea, utile în furnizarea de plante transgenice având o expresie crescută a QPRT-azei și un conținut ridicat de nicotină în plantă. Asemenea constructe, metode care utilizează aceste constructe, precum și plantele obținute în acest fel pot fi dezirabile în realizarea de produse pe bază de tutun având un conținut de nicotină alterat, sau în producerea de plante cu un conținut ridicat de nicotină, folosite datorită efectelor insecticide ale nicotinei.

Prezenții inventatori au descoperit că gena *TobRD2* (a se vedea Conkling și colab., *Plant Phys.* 93, 1203 (1990)) codifică o QPRT-ază din *Nicotiana tabacum* și au furnizat secvența de cADN a *NtQPT1* (denumită formal *TobRD2*), precum și secvența de aminoacizi a enzimei codificate. Comparațiile secvenței de aminoacizi corespunzătoare genei *NtQPT1* cu bazele de date din Banca de Gene relevă o similaritate de secvențe limitată cu proteinele bacteriene care codifică chinolat fosforibozii transferaza (QPRT-aza) (figura 3).

Chinolat fosforibozil transferaza este necesară pentru biosinteza *de novo* a nicotinadenin dinucleotidului (NAD) atât la procariote, cât și la eucariote. În cazul tutunului au fost detectate cantități mari de QPRT-ază în rădăcini, dar nu în frunze. Pentru a determina dacă gena *NtQPT1* codifică QPRT-aza, prezenții inventatori au utilizat tulpina bacteriană de *Escherichia coli* (TH265) - o mutantă cu deficiență de chinolat fosforibozil transferază (*nadC*⁻). Această mutantă nu poate crește pe mediu minimal lipsit de acid nicotinic. Cu toate acestea, expresia proteinei *NtQPT1* în această tulpină bacteriană a conferit fenotipul *NadC*⁺ (figura 4), confirmând faptul că *NtQPT1* codifică QPRT-aza.

Prezenții inventatori au examinat efectele mutantelor *Nic1* și *Nic2* în tutun, precum și efectele retezării părții superioare a plantelor de tutun asupra nivelelor staționare ale ARNm-ului corespunzător genei *NtQPT1* și asupra nivelelor de nicotină. (Este bine cunoscut faptul că îndepărtarea dominanței apicale prin secționarea părții superioare în stadiul de înflorire are ca rezultat nivele crescute ale biosintezei și transportului nicotinei în tutun, și ea constituie o practică standard în producerea tutunului). Dacă gena *NtQPT1* este într-adevăr implicată în biosinteza nicotinei, atunci este de așteptat ca: (1) nivelele ARNm-ului corespunzător genei *NtQPT1* să fie mai mici la mutantele duble *Nic1/Nic2* și (2) nivelele ARNm-ului corespunzător genei *NtQPT1* să fie crescute după secționarea părții superioare. S-a constatat că nivelele ARNm-ului corespunzător genei *NtQPT1* în cazul mutantelor duble *Nic1/Nic2* sunt de aproximativ 25 % din cele ale tipului sălbatic (fig. 5). Mai mult, după 6 h

de la retezarea părții superioare, nivelele ARNm-ului corespunzător genei *NtQPT1* din plantele de tutun au crescut de aproximativ 8 ori. De aceea, s-a stabilit că gena *NtQPT1* este o genă reglatoare cheie din calea de biosinteză a nicotinei.

Celule vegetale și plante transgenice

Reglarea exprimării genei în genomurile celulare vegetale poate fi realizată prin integrarea ADN-ului heterolog sub controlul transcriptional al unui promotor care este funcțional în gazdă, și în care, catena transcrisă a ADN-ului heterolog este complementară catenei de ADN care este transcrisă din gena endogenă care trebuie reglată. ADN-ul introdus, sub formă de ADN antisens, oferă o secvență de ARN care este complementară ARNm-urilor produse în mod natural (endogene) și care inhibă exprimarea ARNm-ului endogen. Mecanismul unei astfel de reglări a exprimării genei prin antisens nu este complet înțeles. Cât timp nu se dorește limitarea la o singură teorie, s-a remarcat că o teorie a propunerilor de reglare antisens a acelei transcrierii a ADN-ului antisens produce molecule de ARN care se leagă de/ și împiedică sau inhibă transcrierea moleculelor endogene de ARNm.

În metodele prezentei invenții, produsul antisens poate fi complementar cu porțiunile codificatoare sau necodificatoare (sau cu ambele) ale ARN-ului țintă existent în mod natural. Construcția antisens poate fi introdusă în celulele vegetale prin orice modalitate adecvată și poate fi integrată în genomul plantei pentru transcrierea inductibilă sau constitutivă a secvenței antisens. A se vedea, spre exemplu, brevetele **US5453566** și **US5107065** ale lui Shewmaker și colab.

Așa cum au fost utilizate aici, denumirile de ADN (sau ARN) heterolog se referă la ADN-ul (sau ARN-ul) care a fost introdus într-o celulă (sau în strămoșul celulei) prin eforturile oamenilor. Un asemenea ADN heterolog poate fi o copie a unei secvențe care se găsește în mod natural în celula astfel transformată, sau fragmente ale acesteia.

Pentru producerea unei plante de tutun cu niveluri scăzute de QPRT-ază și, prin urmare, cu conținut mai mic de nicotină față de o plantă martor de tutun netransformată, se poate transforma o celulă de tutun cu o unitate transcriptională antisens pentru QPRT, exogenă, conținând: o secvență parțială din cADN-ul pentru QPRT; o secvență întreagă din cADN-ul corespunzător pentru QPRT; o secvență cromozomială parțială pentru QPRT; sau o secvență cromozomială întreagă pentru QPRT aflată în orientare antisens cu secvențele reglatoare adecvate legate operațional. Secvențele reglatoare adecvate includ o secvență de inițiere a transcrierii (promotor) operabilă în planta supusă transformării și o secvență de terminare a poliadenilării/transcrierii. În continuare, pentru identificarea clonelor purtătoare ale secvențelor pentru QPRT-ază în orientare antisens, legate operațional de secvențele reglatoare, au fost folosite tehnicile standard cum ar fi: realizarea de hărți de restricție, hibridizarea Southern blot și analiza secvențelor nucleotidice. Plantele de tutun sunt apoi regenerate din celulele transformate cu succes. Cel mai convenabil este ca secvența antisens utilizată să fie complementară secvenței endogene; cu toate acestea, pot fi tolerate variații minore în secvențele exogene și endogene. Este preferabil ca secvența antisens de ADN să aibă o similaritate a secvenței suficientă încât să fie capabilă să se lege de secvența endogenă din celula care trebuie reglată, în condiții stricte, așa cum s-a descris mai jos.

În diferite laboratoare a fost utilizată tehnologia antisens pentru crearea de plante transgenice caracterizate prin cantități mai mici decât normalul din unele enzime specifice. Spre exemplu, au fost obținute plante cu nivele scăzute de calcon sintază - o enzimă dintr-o cale de biosinteză a unui pigment floral, prin inserarea unei gene antisens corespunzătoare calcon sintazei în genomul plantelor de tutun și petunie. Aceste plante transgenice de tutun și petunie produc flori cu o colorație mai slabă decât cea normală (Van der Krol și colab., An Anti-Sense Chalcone Synthase Gene in Transgenic Plants Inhibits Flower Pigmentation,

RO 121968 B1

<i>Nature</i> , 333, pp. 866 - 869 (1988)). De asemenea, tehnologia ARN antisens a fost utilizată	1
cu succes pentru inhibarea producerii enzimei poligalacturonazei la tomate (Smith și colab.,	
Antisense ARN Inhibition of Polygalacturonase Gene Expression in Transgenic Tomatoes,	3
<i>Nature</i> , 334, pp. 724 - 726 (1988); Sheehy și colab., Reduction of Polygalacturonase Activity	
in Tomato Fruit by Antisense ARN, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 85, pp. 8805 -8809 (1988)),	5
și a subunității mici a enzimei ribulozo bisfosfat carboxilaza din tutun (Rodermeel și colab.,	
Nuclear-Organella Interactions: Nuclear Antisense Gene Inhibits Ribulose Biphosphate	7
Carboxylase Enzyme Levels in Transformed Tobacco Plants, <i>Cell</i> , 55, pp. 673 - 681 (1988)).	
În mod alternativ, pot fi create plante transgenice caracterizate prin cantități mai mari decât	9
cele normale dintr-o enzimă dată, prin transformarea plantelor cu ajutorul genei pentru acea	
enzimă în orientare sens (adică normală). Nivelele de nicotină din plantele transgenice de	11
tutun din prezenta invenție pot fi detectate prin determinările standard de nicotină. Plantele	
transformate în care nivelul QPRT-azei este redus, comparativ cu cel din plantele martor	13
netransformate vor avea, ca urmare, un nivel de nicotină redus, comparativ cu martorul;	
plantele transformate în care nivelul QPRT-azei este crescut comparativ cu plantele martor	15
netransformate vor avea, în consecință, un nivel de nicotină crescut, comparativ cu martorul.	
Secvența heteroloagă utilizată în metodele antisens din prezenta invenție poate fi se-	17
lecționată în așa fel încât să conducă la obținerea unui produs ARN complementar cu	
întreaga secvență de ARNm pentru QPRT-ază, sau cu o porțiune a acesteia. Secvența poate	19
fi complementară oricărei secvențe învecinate a ARNm-ului natural, adică, poate fi com-	
plementară cu secvența de ARNm endogen învecinată capătului 5' terminal sau capătului	21
care este izolat în timpul procesului de maturare a ARNm, în aval față de acest ultim capăt	
menționat, sau între acest capăt și codonul de inițiere și poate acoperi întreaga/ sau doar o	23
porțiune din regiunea necodificatoare, poate uni, printr-o punte, regiunea necodificatoare cu	
cea codificatoare, poate fi complementară cu toată/ sau cu o parte a regiunii codificatoare,	25
complementară cu capătul 3' terminal al regiunii codificatoare, sau complementară cu	
regiunea 3' - netradusă a ARNm-ului. Secvențele antisens adecvate pot fi alcătuite din cel	27
puțin 13 până la 15 nucleotide, cel puțin 16 până la 21 de nucleotide, cel puțin 20 de	
nucleotide, cel puțin aproximativ 30 de nucleotide, cel puțin aproximativ 50 de nucleotide, cel	29
puțin 75 de nucleotide, cel puțin 100 de nucleotide, cel puțin 125 de nucleotide, cel puțin 150	
de nucleotide, cel puțin 200 de nucleotide, sau mai multe. În plus, secvențele pot fi extinse	31
sau scurtate la capetele lor 3' sau 5'.	
Secvența particulară antisens și lungimea secvenței antisens vor varia în funcție de	33
gradul de inhibare dorit, de stabilitatea secvenței antisens și de alte criterii asemănătoare.	
Cineva care este expert în domeniu va fi ghidat în selecția secvențelor antisens pentru	35
QPRT-ază, adecvate, cu ajutorul tehnicilor disponibile în domeniu și al informațiilor furnizate	
în prezenta descriere. Cu referire la figura 2A și la SECV ID NR:1 din prezenta invenție, o	37
oligonucleotidă a prezentei invenții poate fi un fragment continuu al secvenței pentru	
QPRT-ază din cADN în orientare antisens, de orice lungime care să fie suficientă pentru	39
realizarea efectelor dorite la transformarea într-o celulă vegetală gazdă.	
Prezenta invenție poate fi, de asemenea, utilizată în metodele de co-supresie a pro-	41
ducerii de nicotină. ADN-urile sens folosite în realizarea prezentei invenții au o lungime su-	
ficientă pentru a suprima (atunci când se exprimă într-o celulă vegetală) exprimarea nativă	43
a proteinei vegetale QPRT-aza, așa cum s-a descris aici, în acea celulă vegetală. Asemenea	
ADN-uri sens pot fi, în esență, un întreg ADN genomic sau complementar care codifică	45
enzima QPRT-aza, sau un fragment din el, cu asemenea fragmente tipice de cel puțin	

RO 121968 B1

1 15 nucleotide, ca lungime. La îndemâna experților în domeniu există metode de stabilire a
lungimii ADN-ului sens care au drept rezultat suprimarea exprimării unei gene native într-o
3 celulă.

Într-o prezentare alternativă a prezentei invenții, celule vegetale de *Nicotiana* sunt
5 transformate cu ajutorul unui construct ADN conținând un segment de ADN care codifică o
moleculă de ARN enzimatică (adică un ribozim), moleculă de ARN enzimatic care este
7 direcționată spre (adică clivează) transcriptul ARNm al ADN-ului care codifică QPRT-aza
vegetală, așa cum s-a descris aici. Ribozimele conțin domenii de legare a substratului care
9 se leagă la regiuni accesibile ale ARNm-ului țintă, precum și domenii care catalizează
clivarea ARN-ului, evitând traducerea și producerea proteinei. Domeniile de legare pot
11 conține secvențe antisens complementare secvenței ARNm-ului țintă; motivul (desenul) ca-
talic poate fi un motiv cap de ciocan sau alte motive, cum ar fi motivul agrafă. Siturile de
13 clivare dintr-o țintă ARN pot fi identificate, mai întâi, prin scanarea moleculei țintă din punct
de vedere al situsurilor de clivare ale ribozimului (ex.: secvențele GUA, GUU sau GUC).
15 Odată identificate, secvențele ARN scurte de 15, 20, 30 sau mai multe ribonucleotide,
corespunzătoare regiunii din gena țintă care conține situsul de clivare pot fi evaluate în
17 scopul prevederii caracteristicilor structurale. Cu ajutorul testelor de protecție ribonucleazică
cunoscute în domeniu, poate fi evaluată și potrivirea (asemănarea) țintelor candidate, prin
19 testarea disponibilității lor pentru hibridizare cu oligonucleotide complementare. ADN-ul care
codifică molecule de ARN enzimatic poate fi produs în conformitate cu tehnicile cunoscute.
21 A se vedea, spre exemplu, T. Cech și colab., **US 4987071**; Keene și colab., **US 5559021**;
Donson și colab., **US 5589367**; Torrence și colab., **US 5583032**; Joyce, **US 5580967**; Gold
23 și colab., **US 5595877**; Wagner și colab., **US 5591601**; și **US 5622854**. Producerea unei
asemenea molecule de ARN enzimatic într-o celulă vegetală și întreruperea producerii
25 proteinei QPRT-aza duc la reducerea activității QPRT-azei în celulele vegetale în aceeași
manieră (în esență) ca și producerea unei molecule de ARN antisens: adică, prin
27 întreruperea traducerii ARNm-ului în celula care produce enzima. Termenul de ribozim este
utilizat aici pentru a descrie un acid nucleic conținând ARN care funcționează ca o enzima
29 (asemenea unei endoribonucleaze) și poate fi utilizat în locul termenului de moleculă de ARN
enzimatic. Prezenta invenție include și: ADN care codifică ribozime; ADN care codifică
31 ribozime care a fost inserat într-un vector de expresie; celule gazdă conținând asemenea
vectori, precum și metode care utilizează ribozime, de reducere a producției de QPRT-ază
33 în plante.

Secvențele de acid nucleic utilizate în realizarea prezentei invenții le includ pe acelea
35 care au o similaritate a secvenței cu SECV ID NR:1 și care codifică o proteină având
activitate de chinolat fosforibozil transferază. Această definiție intenționează să includă va-
37 riațiile naturale alelice din proteinele QPRT-azice. Astfel, secvențele de ADN care
hibridizează cu ADN-ul având secvența SECV ID NR:1 și codifică exprimarea QPRT-azei,
39 în particular enzimele QPRT-azice vegetale, pot fi și ele utilizate în realizarea prezentei
invenții.

41 Pot exista forme multiple ale enzimei QPRT-ază din tutun. Aceste forme multiple ale
unei enzime pot fi datorate modificării post-tranlaționale a unui singur produs al genei, sau
43 formelor multiple ale genei *NtQPT1*.

Condițiile ce permit altor secvențe de ADN care codifică exprimarea unei proteine
45 având activitate QPRT-azică să hibridizeze cu ADN-ul având secvența SECV ID NR:1 sau
cu alte secvențe de ADN care codifică proteina reprezentată prin SECV ID NR:2, pot fi deter-
47 minate printr-o modalitate de rutină. Spre exemplu, hibridizarea unor asemenea secvențe
poate fi derulată în condiții de rigurozitate redusă, sau chiar în condiții riguroase (ex. condiții

RO 121968 B1

reprezentate de o spălare riguroasă cu NaCl 0,3 M, citrat de sodiu 0,03 M, SDS 0,1%, la 60°C sau chiar 70°C pentru ADN-ul care codifică proteina reprezentată aici prin SECV ID NR:2, într-un test standard de hibridizare *in situ*. A se vedea J. Sambrook și colab., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2d Ed. 1989) (Cold Spring Harbor Laboratory)). În general, asemenea secvențe vor fi cel puțin 65% similare, 75% similare, 80% similare, 85% similare, 90% similare, sau chiar 95% similare, sau chiar mai mult, cu secvența reprezentată aici prin SECV ID NR:1, sau cu secvențele de ADN care codifică proteinele având SECV ID NR:2. (Determinările de similaritate a secvențelor au fost făcute cu cele două secvențe aliniate pentru potrivire maximă; pentru sporirea gradului de potrivire sunt permise breșe în oricare dintre cele două secvențe ce sunt asemănate. Sunt preferate lungimi ale breșelor de 10 sau mai puțin, mai preferate sunt lungimile breșelor de 5 sau mai puțin, iar lungimile breșelor de 2 sau mai puțin sunt și mai convenabile).

Există proceduri de hibridizare diferențială care permit izolarea clonelor de cADN ale căror nivele de ARNm sunt de aproximativ 0,05% poli(A⁺)ARN. A se vedea M. Conkling și colab., *Plant Physiol.* **93**, 1203 - 1211 (1990). Pe scurt, băncile de cADN sunt supuse screeningului, folosind sonde de cADN mono-catenar, din punct de vedere al ARNm-ului revers transcris din țesutul vegetal (ex. rădăcini și/sau frunze). Pentru screeningul diferențial se procedează astfel: o membrană de nitroceluloză sau de nylon este îmbibată de 5 ori în SSC, plasată într-un colector sub vid având 96 de godeuri, 150 μL din cultura staționară peste noapte sunt transferați dintr-o placă stoc (mamă) în fiecare godeu și supuși presiunii sub vid până când tot lichidul trece prin filtru. 150 μL din soluția denaturantă (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M) sunt plasați în fiecare godeu, cu ajutorul unei pipete și lăsați să stea aproximativ 3 min. Se aspiră ca și mai sus, iar filtrul este îndepărtat și neutralizat în Tris-HCl 0,5 M (pH 8,0), NaCl 1,5 M. Filtrul este uscat apoi 2 h *in vacuo* și incubat cu sondele relevante. Prin utilizarea filtrelor membranare din nylon și păstrarea plăcilor principale depozitate la -70°C în DMSO 7%, filtrele pot fi supuse screeningului de mai multe ori, cu multiple sonde, iar clonele particulare pot fi recuperate după câțiva ani de depozitare.

După cum a fost utilizat aici, termenul de "genă" se referă la o secvență de ADN care încorporează: (1) semnale reglatoare, incluzând promotorul, situate în amonte de capătul 5', (2) o regiune codificatoare specificând produsul (proteină sau ARN) al genei, (3) regiuni situate în aval de capătul 3', incluzând semnale de poliadenilare și de terminare a transcrierii și (4) secvențe asociate, necesare unei exprimări eficiente și specifice.

Secvența de ADN conform prezentei invenții poate fi constituită, în esență, din secvența furnizată în prezenta descriere (SECV ID NR:1), sau din secvențe nucleotidice echivalente reprezentând variante alele sau polimorfe ale acestor gene, sau din regiuni codificatoare, ale acestora.

Utilizarea frazei "similaritate substanțială a secvențelor" în prezenta descriere și în revendicări se referă la faptul că ADN-ul, ARN-ul sau secvențele de aminoacizi care au variații ușoare și lipsite de consecințe de la secvențele reale descrise și revendicate în prezenta cerere sunt considerate a fi echivalente cu secvențele prezentei invenții. Din acest punct de vedere, "variații secvențiale ușoare și lipsite de consecințe" înseamnă că secvențe "similare" (adică, secvențele care au o similaritate substanțială a secvențelor cu ADN-ul, ARN-ul sau cu proteinele descrise și revendicate în prezenta cerere) vor fi echivalente din punct de vedere funcțional cu secvențele descrise și revendicate în prezenta invenție. Secvențele echivalente funcțional vor funcționa, în esență, în aceeași manieră pentru a produce, în principal, aceleași compoziții ca și compozițiile de acizi nucleici și de aminoacizi descrise și revendicate în prezenta lucrare.

1 Secvențele de ADN furnizate în prezenta invenție pot fi transformate într-o varietate
2 de celule gazdă. În domeniu există și sunt ușor accesibile o varietate de celule gazdă po-
3 trivite, având proprietățile de cultivare și de manipulare dorite.

4 Utilizarea expresiei "izolat" sau "substanțial pur" în prezenta descriere și în
5 revendicări ca un modificator al ADN, ARN, polipeptide sau proteine înseamnă că ADN-ul,
6 ARN-ul, polipeptidele sau proteinele astfel desemnate au fost separate de mediile lor
7 celulare *in vivo*, prin eforturile oamenilor. Așa cum a fost utilizată aici, o "secvență de ADN
8 nativ" sau "secvența de ADN natural" înseamnă o secvență de ADN care poate fi izolată din
9 țesuturi sau celule netransgenice. Secvențele de ADN nativ sunt acelea care nu au fost
10 alterate artificial, cum ar fi prin mutageneza direcționată către un anumit situs. Odată iden-
11 tificate secvențele de ADN nativ, moleculele de ADN având secvențe de ADN nativ pot fi
12 sintetizate chimic sau produse cu ajutorul procedeeleor de ADN recombinant, după cum se
13 cunoaște în domeniu. Așa cum este folosită în prezenta invenție, o secvență de ADN vegetal
14 nativ este aceea care poate fi izolată din țesuturi sau celule de plante netransgenice. Așa
15 cum s-a folosit în prezenta invenție, o secvență de ADN nativ din tutun este aceea care
16 poate fi izolată din țesuturi sau celule netransgenice de tutun.

17 Constructele ADN, sau "casetele de transcriere" din prezenta invenție includ, de la
18 capătul 5' până la capătul 3' în direcția transcrierii: un promotor, așa cum s-a discutat an-
19 terior, o secvență de ADN, așa cum s-a discutat anterior în descriere, asociată operațional
20 cu promotorul; și opțional, o secvență de terminare care include semnalul stop pentru ARN
21 polimerază și un semnal de poliadenilare pentru poliadenilază. Toate aceste regiuni
22 reglatoare trebuie să fie capabile să opereze în celulele țesutului care trebuie transformat.
23 Orice semnal de terminare adecvat poate fi folosit în realizarea prezentei invenții, exemple
24 de acest fel incluzând, dar nelimitându-se la: terminatorul pentru nopalina sintază (*nos*),
25 terminatorul pentru octapina sintază (*ocs*), terminatorul CaMV sau semnalele native de ter-
26 minare derivate din aceeași genă ca și regiunea de inițiere transcripțională sau derivate
27 dintr-o genă diferită. A se vedea, spre exemplu: Rezian și colab., (1988) de mai sus, și
28 Rodermel și colab. (1988), de mai sus.

29 Termenul de "asociat în mod operativ", așa cum a fost întrebuințat în prezenta
30 descriere, se referă la secvențele de ADN de pe o singură moleculă de ADN, care sunt aso-
31 ciate în așa fel încât funcționarea uneia să fie afectată de către cealaltă. Astfel, un promotor
32 este asociat în mod operativ cu un ADN atunci când este capabil să afecteze transcrierea
33 acelui ADN (adică ADN-ul se află sub controlul transcripțional al promotorului). Se spune că
34 promotorul este în amonte față de ADN, despre care se spune, la rândul său, că este "în
35 aval" față de promotor.

36 Casetă de transcriere poate fi furnizată într-un construct ADN care are, de asemenea,
37 cel puțin un sistem de replicare. Pentru comoditate, se obișnuiește să se folosească un
38 sistem de replicare funcțional în *Escherichia coli*, cum ar fi ColE1, pSC101, pACYC184, sau
39 altele de acest fel. În această manieră, la fiecare stadiu, după fiecare manipulare, constructul
40 rezultat poate fi clonat, secvențializat și determinată corectitudinea manipulării. În plus, sau
41 în locul sistemului de replicare *E. coli*, poate fi întrebuințată o gamă largă de sisteme gazdă
42 pentru replicare, cum ar fi sistemul de replicare al plasmideilor P-1 de incompatibilitate, spre
43 exemplu, pRK290. În afara sistemului de replicare, există în mod frecvent cel puțin un marker
44 prezent, care poate fi util în una sau mai multe gazde, sau markeri diferiți pentru gazde di-
45 ferite. Adică, un marker poate fi utilizat pentru selecția într-o gazdă procariotă, în timp ce un
46 alt marker poate fi întrebuințat pentru selecția într-o gazdă eucariotă, în particular, gazda
47 vegetală. Markerii pot oferi protecție împotriva unui biocid, cum este cazul antibioticelor,
48 toxinelor, metalelor grele, sau al altora de acest tip; pot oferi complementaritate prin

RO 121968 B1

împărțirea prototrofiei cu o gazdă auxotrofă; sau pot oferi un fenotip vizibil, prin producerea unui compus nou în plantă.	1
Diferite fragmente conținând diverși constructi, casete de transcriere, markeri și altele de acest tip, pot fi introduse consecutiv, prin clivarea enzimei de restricție a unui sistem de replicare adecvat și inserarea constructului sau fragmentului particular în situsul disponibil.	3
După ligare și clonare, constructul ADN poate fi izolat pentru manipularea ulterioară. Toate aceste tehnici sunt amplu exemplificate în literatură, așa cum au făcut J. Sambrook și colab.,	5
<i>Molecular Cloning, A Laboratory Manual</i> (2d Ed. 1989) (Cold Spring Harbor Laboratory).	7
Vectorii prevăzuți în prezenta invenție care pot fi utilizați pentru transformarea țesutului vegetal cu construcți de acizi nucleici, includ atât vectori <i>Agrobacterium</i> , cât și vectori balistici, precum și vectori adecvați transformării mediate de ADN.	9
Termenul de "promotor" se referă la o regiune a unei secvențe de ADN care încorporează semnalele necesare pentru exprimarea eficientă a secvenței codificatoare.	11
Acesta include secvențe la care se leagă o ARN polimerază, dar nu se limitează la asemenea secvențe și poate include regiuni la care se leagă alte proteine reglatoare, împreună cu regiuni implicate în controlul traducerii proteice, precum și secvențe de codificare.	13
Promotorii utilizați în realizarea prezentei invenții pot fi promotori activi constitutiv.	15
Sunt accesibili numeroși promotori activi constitutiv care sunt operabili în plante. Un exemplu convenabil este promotorul 35S al virusului mozaicului conopidei (CaMV = Cauliflower Mosaic Virus) care este exprimat constitutiv în majoritatea țesuturilor vegetale. Ca alternativă, promotorul poate fi un promotor specific rădăcinii, sau promotor specific cortexului rădăcinii, așa cum se explică mai detaliat, mai jos.	17
Au fost exprimate secvențe antisens în plante transgenice de tutun, utilizând promotorul 35S al virusului mozaicului conopidei (CaMV). A se vedea, spre exemplu, Cornelissen și colab., "Both RNA Level and Translation Efficiency are Reduced by Anti-Sense RNA in Transgenic Tobacco", <i>Nucleic Acids Res.</i> 17, pp. 833 - 843 (1989); Rezaian și colab., "Anti-sense RNAs of Cucumber Mosaic Virus in Transgenic Plants Assessed for Control of the Virus", <i>Plant Molecular Biology</i> 11, pp. 463 - 471 (1988); Rodermeel și colab., "Nuclear-Organelle Interactions: Nuclear Antisense Gene Inhibits Ribulose Bisphosphate Carboxylase Enzyme Levels in Transformed Tobacco Plants", <i>Cell</i> 55, pp. 673 - 681 (1988); Smith și colab., "Antisense ARN Inhibition of Polygalacturonase Gene Expression in Transgenic Tomatoes", <i>Nature</i> 334, pp. 724 - 726 (1988); Van der Krol și colab., "An Anti-Sense Chalcone Synthase Gene in Transgenic Plants Inhibits Flower Pigmentation", <i>Nature</i> 333, pp. 866 - 869 (1988).	23
Se preferă utilizarea promotorului 35S CaMV pentru exprimarea QPRT-azei în plantele și celulele de tutun transformate ale acestei invenții. Utilizarea promotorului CaMV pentru exprimarea altor gene recombinante în rădăcinile de tutun a fost bine descrisă (Lam și colab., "Site-Specific Mutations Alter In Vitro Factor Binding and Change Promoter Expression Pattern in Transgenic Plants", <i>Proc. Nat. Acad. Sci. USA</i> 86, pp. 7890 - 7894 (1989); Poulsen și colab., "Dissection of 5' Upstream Sequences for Selective Expression of the Nicotiana plumbaginifolia rbcS-8B Gene", <i>Mol. Gen. Genet.</i> 214, pp. 16-23 (1988)).	25
De asemenea, și alți promotori care sunt activi doar în țesuturile radiculare (promotori specifici rădăcinii) sunt adecvați, în mod particular, metodelor din prezenta invenție. A se vedea, spre exemplu, brevetul US 5459252 de Conkling și colab.; Yamamoto și colab., <i>The Plant Cell</i> , 3: 371 (1991). Poate fi utilizat, de asemenea, promotorul specific cortexului rădăcinii - TobRD2. A se vedea, spre exemplu, cererea de brevet americană SN 08/508.786, admisă lui Conkling et al; PCT WO 9705261 . Toate brevetele citate aici vor fi încorporate în întregime aici, ca referințe.	27
	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47

1 Moleculele de ADN recombinant pentru QPRT-ază și vectorii utilizați pentru pro-
ducerea celulelor și plantelor de tutun transformate din prezenta invenție pot conține, în plus,
3 o genă marker selectabilă dominantă. Markerii selectabili dominanți potriviți pentru utilizarea
la tutun includ, între altele, gene de rezistență la antibiotice care codifică neomicin
5 fosfotransferaza (NPTII), higromicin fosfotransferaza (HPT) și cloramfenicol acetiltransferaza
(CAT). Un alt marker selectabil dominant bine cunoscut, adecvat utilizării la tutun este o genă
7 mutantă pentru dihidrofolat reductază, care codifică dihidrofolat reductaza rezistentă la me-
totrexat. Vectori de ADN conținând gene adecvate pentru rezistența la antibiotice, precum
9 și antibioticele corespunzătoare sunt disponibile comercial.

11 Celulele de tutun transformate sunt separate de populația înconjurătoare a celulelor
netransformate prin plasarea populației amestecate de celule într-un mediu de cultură
13 conținând o concentrație corespunzătoare din antibioticul (sau din alt compus toxic pentru
celulele de tutun) la care produsul genei marker dominant selectabilă îi conferă rezistență.
Astfel, doar acele celule de tutun care au fost transformate vor supraviețui și se vor
15 multiplica.

Metodele de obținere a plantelor recombinante ale prezentei invenții implică, în ge-
17 neral, în primul rând, furnizarea unei celule vegetale capabile de regenerare (celula vegetală
aflându-se, în mod tipic, într-un țesut capabil de regenerare). Celula vegetală este trans-
formată apoi cu un construct ADN conținând o casetă de transcriere din prezenta invenție
19 (așa cum a fost descrisă anterior) iar din celula vegetală transformată este regenerată o
plantă recombinantă. Așa cum este explicat mai jos, etapa de transformare a fost efectuată
21 prin tehnici care sunt cunoscute în domeniu incluzând, dar nelimitându-se la: bombardarea
celulei vegetale cu microparticule care poartă caseta de transcriere; infectarea celulei cu un
23 *Agrobacterium tumefaciens* conținând o plasmidă Ti care poartă caseta de transcriere; sau
orice altă tehnică adecvată de producere a unei plante transgenice.

Sunt cunoscute numeroase sisteme vectoare de *Agrobacterium*, utile în realizarea
27 prezentei invenții. Spre exemplu, brevetul **US 4459355** descrie o metodă pentru trans-
formarea plantelor susceptibile, incluzând dicotiledonatele, cu o tulpină de *Agrobacterium*
29 conținând plasmida Ti. Transformarea plantelor lemnoase cu un vector de *Agrobacterium*
este prezentată în brevetul **US 4795855**. Mai mult, brevetul **US 4940838** al lui Schilperoort
31 și colab. descrie un vector binar de *Agrobacterium* (adică un vector în care *Agrobacterium*
conține o plasmidă având regiunea vir a unei plasmide Ti, dar nu și regiunea T, și o a doua
33 plasmidă având o regiune T, dar nu și regiunea vir) util în realizarea prezentei invenții.

Microparticulele purtătoare ale unui construct ADN din prezenta invenție - micro-
35 particule care sunt adecvate transformării balistice a unei celule vegetale sunt utile, de
asemenea, și pentru obținerea plantelor transformate din prezenta invenție. Microparticula
37 este propulsată într-o celulă vegetală pentru a produce o celulă vegetală transformată din
care se regenerează o plantă. Pentru realizarea practică a prezentei invenții pot fi utilizate
39 orice metodologii și orice aparatură de transformare balistică a celulei. Aparatură și procedee
exemplare au fost descrise de către Sanford și Wolf în brevetul **US 4945050** și de către
41 Christou și col., în brevetul **US 5015580**. La utilizarea procedeeelor de transformare balistică,
caseta de transcriere poate fi încorporată într-o plasmidă capabilă de replicare în/ sau de
43 integrare în celula care trebuie transformată. Exemple de microparticule potrivite pentru a
fi utilizate în asemenea sisteme includ sfere de aur de 1 - 5 μm. Constructul de ADN poate
45 fi depozitat pe microparticulă cu ajutorul oricărei tehnici adecvate, cum ar fi precipitarea.

Specii de plante pot fi transformate cu constructul de ADN din prezenta invenție prin
47 transformarea mediată de ADN a protoplaștilor de celule vegetale și regenerarea ulterioară
a plantei din protoplaștii transformați, în conformitate cu procedeele bine cunoscute în

RO 121968 B1

domeniu. Este cunoscută în domeniu fuziunea protoplaștilor de tutun cu lipozomi conținând ADN sau via electroporare (Shillito și colab., "Direct Gene Transfer to Protoplasts of Dicotyledonous and Monocotyledonous Plants by a Number of Methods, Including Electroporation", *Methods in Enzymology* 153, pp. 313 - 336 (1987)).

Așa cum a fost utilizată în prezenta invenției, transformarea se referă la introducerea de ADN exogen în celule ca să producă celule transgenice transformate în mod stabil cu ADN-ul exogen.

Celulele transformate sunt induse pentru a regenera plante intacte de tutun prin aplicarea tehnicilor de culturi de celule și de țesuturi de tutun -tehnici care sunt bine cunoscute în domeniu. Metoda regenerării vegetale este aleasă în așa fel încât să fie compatibilă cu metoda de transformare. Prezența stabilă și orientarea secvenței QPRT-azei în plantele transgenice de tutun pot fi verificate prin moștenirea Mendeliană a secvenței QPRT-azei, așa cum s-a relevat prin metodele standard ale analizei ADN-ului aplicate descendentului rezultat din încrucișări controlate. După regenerarea plantelor transgenice de tutun din celule transformate, secvența de ADN introdusă este transferată rapid altor varietăți de tutun prin practicile convenționale de ameliorare a plantelor și fără o experimentare excesivă.

Spre exemplu, pentru a analiza segregarea transgenei, plantele transformate regenerate (R_0) pot fi crescute până la maturitate, testate din punctul de vedere al conținutului de nicotină și refăcute pentru a produce plante R_1 . Un procent de plante R_1 purtătoare ale transgenei sunt homozigoți pentru transgenă. Pentru identificarea plantelor homozigote R_1 , plantele transgenice R_1 sunt crescute până la maturitate și refăcute. Plantele homozigote R_1 vor produce descendentul R_2 unde fiecare plantă descendentă este purtătoare a transgenei; descendentul plantelor heterozigote R_1 va segrega 3:1.

Deoarece nicotina servește drept pesticid natural, ea ajută la protecția plantelor de tutun de atacul dăunătorilor. De aceea, poate fi de dorit o transformare suplimentară a plantelor cu conținut redus/ sau lipsite de nicotină produse prin metodele prezente, cu ajutorul unei transgene (cum ar fi *Bacillus thuringiensis*) care va conferi o protecție suplimentară împotriva insectelor.

O plantă preferată pentru utilizare în prezentele metode este specia *Nicotiana*, sau tutunul, incluzând: *N. tabacum*, *N. rustica* și *N. glutinosa*. Poate fi utilizată orice tulpină sau varietate de tutun. Sunt preferate tulpinile care au deja un conținut scăzut de nicotină, cum ar fi mutantele duble *Nic1/Nic2*.

Orice țesut vegetal capabil de propagare clonală ulterioară, fie prin organogeneză, fie prin embriogeneză, poate fi transformat cu un vector din prezenta invenție. Termenul de "organogeneză", așa cum a fost el utilizat în prezenta lucrare, desemnează un procedeu prin care, din centri meristematici se dezvoltă în mod secvențial (în etape) tulpini și rădăcini; termenul de embriogeneză, așa cum a fost utilizat aici, înseamnă un procedeu prin care tulpinile și rădăcinile se dezvoltă împreună, în mod concertat (nu secvențial), fie din celule somatice, fie din gârmeți. Țesutul particular ales va varia în funcție de sistemele de propagare clonală disponibile pentru/ și cele mai adecvate pentru speciile particulare care sunt supuse transformării. Țesuturi țintă exemplare includ: discuri din frunze; țesut de: polen, embrion, cotiledoane, hipocotile, calus; țesut meristematic existent (ex. meristeme apicale, muguri axilari și meristeme radiculare); precum și țesut meristemic indus (ex. meristem de cotiledon și meristem de hipocotil).

Plantele din prezenta invenție pot lua o varietate de forme. Plantele pot fi himere de celule transformate și celule netransformate; plantele pot fi transformanți clonali (ex. toate celulele transformate în sensul să conțină caseta de transcriere); plantele pot conține altoi de țesuturi transformate sau netransformate (ex. un trunchi de rădăcină transformată altoită

pe un butaș netransformat, în cazul speciilor de citrice). Plantele transformate pot fi propagate printr-o varietate de modalități, cum ar fi propagarea clonală sau tehnicile clasice de ameliorare. Spre exemplu, prima generație (sau T1) de plante transformate poate fi regenerată pentru a da a doua generație homozigotată (sau T2) de plante transformate, iar plantele T2 propagate ulterior prin tehnici clasice de ameliorare. Un marker selectabil dominant (cum ar fi nptII) poate fi asociat cu caseta de transcriere pentru a ajuta ameliorarea.

Având în vedere cele spuse anterior, este evident că plantele care pot fi utilizate în realizarea practică a prezentei invenții le includ pe cele din genul *Nicotiana*.

Specialiștii familiarizați cu metodele de ADN recombinant descrise anterior vor recunoaște că pentru a construi celule și plante transgenice de tutun se poate folosi o moleculă întreagă de cADN pentru QPRT-ază sau o genă cromozomală completă pentru QPRT-ază, unită în orientare sens, cu secvențele reglatoare corespunzătoare legate operațional. (Experții în domeniu vor admite și faptul că secvențele reglatoare potrivite pentru exprimarea genelor în orientare sens includ oricare dintre secvențele eucariote de inițiere a traducerii, în afara promotorului și a secvențelor de terminare a poliadenilării/transcrierii - secvențe descrise anterior). Asemenea plante de tutun transformate sunt caracterizate prin nivele crescute de QPRT-ază și, ca urmare, prin conținuturi mai mari de nicotină față de plantele martor de tutun, netransformate.

De aceea, trebuie înțeles faptul că utilizarea secvențelor de ADN care codifică QPRT-aza pentru a scădea sau pentru a crește nivelele enzimei QPRT-aza și, în felul acesta pentru a reduce sau a spori conținutul de nicotină din plantele de tutun, corespunde scopului prezentei invenții.

Așa cum s-a folosit aici, o cultură conține o mulțime de plante ale prezentei invenții aparținând aceluiași gen, plantate împreună într-un câmp agricol. Prin termenul de câmp agricol se înțelege o bucată de teren, sau o seră. Astfel, prezenta invenție furnizează o metodă de producere a unei culturi de plante având alterată activitatea QPRT-azică și, în felul acesta, având nivele crescute sau scăzute de nicotină, comparativ cu o cultură similară de plante netransformate aparținând aceleiași specii și varietăți.

Se dau în continuare exemple nelimitative care ilustrează prezenta invenție.

Exemplul 1. Izolarea și secvențializarea

cADN-ul genei *TobRD2* (Conkling și colab., *Plant Phys.* 93, 1203 (1990)) a fost secvențializat și furnizat în prezenta descriere sub forma SECV ID NR: 1, iar secvența de aminoacizi a fost dedusă ca SECV ID NR: 2. S-a presupus că secvența de aminoacizi dedusă ar fi o proteină citosolică. Deși nu au fost raportate gene pentru QPRT-aza vegetală, comparațiile între secvența de aminoacizi a *NtPT1* și baza de date a Băncii de Gene (fig. 3) au relevat o similaritate secvențială limitată cu anumite proteine bacteriene sau cu alte proteine; activitatea chinolat fosforibozil transferazică (QPRT-azică) a fost demonstrată pentru gene de la *S. typhimurium*, *E. coli* și *N. tabacum*. QPRT-aza codificată de gena *NtQPT1* a fost asemănătoare fragmentului peptidic dedus și codificat de o secvență de expresie EST (expression sequence tags) de la *Arabidopsis* (având numărul de acces la Banca de gene F20096), care poate reprezenta o parte din gena pentru QPRT-ază de la *Arabidopsis*.

Exemplul 2. Hibridizări in situ

Pentru a determina distribuția spațială a transcripților *TobRD2* ai ARNm-ului în diferite țesuturi ale rădăcinii, au fost efectuate hibridizări *in situ* în plante netransformate. Hibridizările *in situ* ale catenei antisens pentru *TobRD2* cu ARNm-ul pentru *TobRD2* în țesut radicular au fost făcute cu ajutorul unor tehnici ca acelea descrise de Meyerowitz, *Plant Mol. Biol. Rep.* 5,

242 (1987) și Smith și colab., *Plant Mol. Biol. Rep.* **5**, 237 (1987). Rădăcini provenind de la plantule de tutun (*Nicotiana tabacum*) de 7 zile au fost fixate în glutaraldehidă tamponată în fosfat, introduse în Paraplast Plus (Monoject Inc., St. Louis, MO) și secționare la 8 mm grosime pentru obținerea de secțiuni, atât transversale, cât și longitudinale. Transcripții TobRD2 antisens, sintetizați *in vitro* în prezență de ATP-35S au fost întrebuințați drept sonde. ARN-ul marcat a fost hidrolizat prin tratament alcalin, cu producerea unei obținându-se o masă cu lungime medie, înainte de utilizare, de 100 - 200 de baze.

Hibridizările au fost făcute în formamidă 50%, timp de 16 h, la 42°C, cu ARN marcat - aproximativ 5×10^6 unități per minut (cpm = "counts-per-minute") per mililitru din soluția de hibridizare. După expunere, lamele au fost dezvoltate și vizualizate prin microscopie optică (în câmp luminat și neluminat).

Semnalul de hibridizare a fost localizat la nivelul stratului cortical al celulelor din rădăcini (nu sunt prezentate rezultatele). Compararea imaginilor în câmp luminat și neluminat a aceluiași secțiuni a dus la localizarea transcripților TobRD2 în celulele parenchimatoase ale cortexului rădăcinii. În epidermă sau în stern nu a fost vizibil nici un semnal de hibridizare.

Exemplul 3. Nivelele ARNm-ului corespunzător TobRD2 în mutantele de tutun Nic1 și Nic2 și corelarea lor cu nivelele de nicotină

Au fost examinate nivelele staționare ale ARNm-ului corespunzător genei TobRD2 în plantele de tutun mutante *Nic1* și *Nic2*. Se cunoaște faptul că genele *Nic1* și *Nic2* reglează activitatea chinolat fosforibozil transferazei și activitatea metil transferazei de putrefacție și sunt reglatori co-dominanți ai producerii nicotinei. Prezentele rezultate sunt ilustrate în figurile 5A și 5B și arată că exprimarea genei *TobRD2* este reglată de către *Nic1* și *Nic2*.

ARN-ul a fost izolat din: rădăcini de plante de tutun de tip sălbatic Burley 21 (*Nic1/Nic1 Nic2/Nic2*); rădăcini ale *Nic1-Burley 21 (nic1/nic1 Nic2/Nic2)*; rădăcini ale *Nic2-Burley 21 (Nic1/Nic1 nic2/nic2)* și din rădăcini ale *Nic1-Nic2- Burley 21 (nic1/nic1 nic2/nic2)*.

Au fost cultivate în sol, din semințe, patru linii de tutun Burley 21 (*nic*) timp de o lună, care au fost transferate în camere hidropone în soluție nutritivă aerată, în seră, timp de o lună. Aceste linii au fost izogene, cu excepția celor două locusuri corespunzătoare nivelului scăzut de nicotină și au avut genotipurile *Nic1/Nic1 Nic2/Nic2*, *Nic1/Nic1 nic2/nic2*, *nic1/nic1 Nic2/Nic2*, *nic1/nic1 nic2/nic2*. Au fost prelevate rădăcinile de la aproximativ 20 de plante pentru fiecare genotip și reunite pentru izolarea ARN-ului. ARN-ul total (1 μg) de la fiecare genotip a fost supus electroforezei într-un gel de agaroză 1% conținând formaldehidă 1,1 M și transferat pe o membrană de nylon, în conformitate cu Sambrook și colab., (1989). Membranele au fost hibridizate cu fragmente de cADN pentru TobRD2, marcate cu P32. Intensitatea relativă a transcripților TobRD2 a fost măsurată prin densitometrie. Figura 5 (bare pline) ilustrează nivelele relative ale transcriptului (comparativ cu *Nic1/Nic1 Nic2/Nic2*) pentru fiecare dintre cele 4 genotipuri. Conținutul relativ al nicotinei (comparativ cu *Nic1/Nic1 Nic2/Nic2*) al celor 4 genotipuri este reprezentat prin bare hașurate.

Fig. 5 compară grafic nivelul relativ, al stării staționare, al ARNm-ului corespunzător genei *TobRD2*, utilizând drept cantitate de referință nivelul găsit în tipul sălbatic de tutun Burley 21 (*Nic1/Nic1 Nic2/Nic2*). Nivelele de ARNm corespunzător *TobRD2* în mutantele duble *Nic1/Nic2* au fost de aproximativ 25% din cele al tutunului de tip sălbatic. Fig. 5B compară suplimentar nivelele relative de nicotină din liniile aproape izogene de tutun studiate în acest exemplu (barele solide indică nivelul transcriptului lui *TobRD2* barele hașurate indică nivelul de nicotină). A existat o corelație strânsă între nivelele de nicotină și nivelele transcriptului corespunzător lui *TobRD2*.

Exemplul 4. Efectul retezării apicale asupra nivelelor de ARNm corespunzător lui TobRD2.

Este bine cunoscut în domeniu faptul că îndepărtarea capătului floral al unei plante (cârnirea) accelerează creșterea rădăcinii și sporește conținutul de nicotină al frunzelor acelei plante. Cârnirea plantei constituie o practică standard în cultivarea de tutun comercial, iar momentul optim pentru cârnirea unei anumite plante de tutun, într-un set cunoscut de condiții de creștere, poate fi determinat rapid de către un cunoscător din domeniu.

Din semințe au fost obținute plante de tutun (*N. tabacum* SR1) care au fost cultivate în sol timp de o lună, apoi transferate în vase cu nisip. Plantele au fost crescute în seră timp de încă 2 luni, până când a început înflorirea. Capetele florale și încă 2 noduri au fost îndepărtate de la 4 plante (cârnite). După timpul indicat s-a prelevat câte o parte din rădăcinile fiecărei plante care au fost reunite în scopul extragerii ARN-ului. Plantele martor nu au fost decapitate. ARN-ul total (1 μg) din fiecare moment de timp a fost supus electroforezei într-un gel de agaroză 1% conținând formaldehidă 1,1 M, apoi transferat pe o membrană de nylon, după recomandarea lui Sambrook și colab., (1989). Membranele au fost hibridizate cu fragmente de cADN pentru TobRD2 marcate cu P³². Intensitatea relativă a transcripților TobRD2 a fost măsurată prin densitometrie. Fig. 6 ilustrează nivelele relative ale transcriptului (comparativ cu momentul zero) pentru fiecare moment de timp, cu cârnire (bare solide), sau fără cârnire (bare hașurate).

Au fost determinate nivelele relative ale TobRD2 în țesutul radicular după 24 h; rezultatele sunt prezentate în fig. 6 (barele solide indică nivelele transcriptului lui TobRD2 în plantele cârnite; barele hașurate indică nivelele transcriptului lui TobRD2 în martorii necârniți). În 6 h de la cârnirea plantelor de tutun, nivelele de ARNm pentru TobRD2 au crescut de aproximativ 8 ori în plantele cârnite; după aceeași perioadă de timp, în plantele martor nu s-a înregistrat nici o creștere.

Exemplul 5. Complementarea mutantei bacteriene cu deficiență de QPRT-ază cu ADN având SECV ID NR: 1

Tulpina TH265 de *Escherichia coli* este o mutantă cu deficiență de chinolat fosforibozil transferaza (nadC⁻) care, drept urmare, nu poate crește pe medii lipsite de acid nicotinic.

Celulele TH265 au fost transformate cu un vector de exprimare (pWS161) conținând ADN cu SECV ID NR:1, sau transformate doar cu vectorul de exprimare (pKK233). Creșterea bacteriei transformate a fost comparată cu creșterea transformanților TH265 (pKK233) și cu creșterea mutantului netransformat TH265 nadC. Creșterea a fost comparată pe mediu minimal ME (lipsit de acid nicotinic) cu cea de pe mediu minimal ME cu adaos de acid nicotinic.

Tulpina TH265 de *E. coli* cu mutația QPTază (*nadC*) a fost oferită cu amabilitate de către Dr. KT. Huges (Huges și colab., J. Bact. 175: 479 (1993). Celulele au fost păstrate pe mediu LB, iar celulele competente au fost preparate după metoda lui Sambrook și col. (1989). O plasmidă de exprimare a fost construită în pKK2233 (Brosius, 1984) cu cADN-ul pentru TobRD2 clonat sub controlul promotorului Tac. Plasmida rezultantă pWS161 a fost transformată în celule TH265. Celulele transformate au fost trecute apoi pe plăci agarizate conținând mediu minimal (Vogel și Bonner, 1956) cu sau fără acid nicotinic (0,0002%) ca supliment. Celulele TH265 singure și celulele TH265 transformate cu pKK2233 au fost trecute pe plăci similare, pentru a fi utilizate ca martori.

Rezultatele sunt prezentate în fig. 4. Doar celulele TH265 transformate cu ADN având SECV ID NR:1 au crescut pe mediu lipsit de acid nicotinic. Aceste rezultate arată că exprimarea ADN-ului având SECV ID NR:1 în celulele bacteriene TH265 a conferit acestor celule fenotipul NadC⁺, confirmând faptul că această secvență codifică QPRT-aza. Nomenclatura TobRD2 a fost schimbată astfel în *NtQPT1*.

RO 121968 B1

Exemplul 6. Transformarea plantelor de tutun	1
ADN-ul având SECV ID NR:1, aflat în orientare antisens, este legat operațional de un promotor vegetal (CaMV 35S sau promotorul TobRD2 specific cortexului rădăcinii) pentru a produce două casete de ADN diferite: promotor CaMV35S / SECV ID NR:1 antisens și promotor TobRD2 / SECV ID NR:1 antisens.	3
Au fost selecționate pentru transformare o linie de tutun de tip sălbatic și o linie de tutun cu conținut redus de nicotină, spre exemplu, linia Burley 21 de tip sălbatic (<i>Nic1+/Nic2+</i>) și linia Burley 21 homozigotă <i>nic1-/nic2-</i> . O mulțime de celule de tutun de la fiecare linie au fost transformate cu ajutorul fiecărei casete ADN. Transformarea a fost efectuată cu ajutorul unui vector de <i>Agrobacterium</i> , spre exemplu un vector binar de <i>Agrobacterium</i> purtător al secvențelor Ti-graniță și al genei <i>nptII</i> (care conferă rezistența la kanamicină și sub controlul promotorului nos (<i>npt II</i>)).	5
Celulele transformate sunt selecționate și regenerare în plante transgenice de tutun (R_0). Plantele sunt cultivate până la maturitate și testate din punct de vedere al conținutului de nicotină; un subset de plante de tutun transformate prezintă nivele de nicotină semnificativ scăzute, comparativ cu plantele martor netransformate.	7
Sunt apoi regenerare plantele R_0 , iar segregarea transgenei este analizată în cadrul generației următoare, R_1 . Generația R_1 este cultivată până la maturitate și regenerată; segregarea transgenei printre descendenții R_2 indică care plante R_1 sunt homozigote în ceea ce privește transgena.	9
	11
	13
	15
	17
	19
	21
LISTA DE SECVENȚE	23
(1) INFORMAȚII GENERALE	25
(i) SOLICITANT: Conkling, Mark A.	27
Mendu, Nandini	
Song, Wen	29
(ii) TITLUL INVENȚIEI: Reglarea exprimării chinolat fosforibozil transferazei	
(iii) NUMĂRUL DE SECVENȚE: 4	31
(iv) ADRESA DE CORESPONDENȚĂ:	
(A) ADRESA: Kenneth Sibley, BellSeltzer Park & Gibson	33
(B) Post Office Drawer 34009	
(C) CITY: Charlotte	35
(D) STATE: North Carolina	
(E) CONTRY: USA	37
(F) ZIP:28234	
(v) FORMA SUB CARE POATE FI CITITA INFORMAȚIA	39
(A) MEDIUL SUPT AL INFORMAȚIEI: disketă	
(B) CALCULATOR: IBM PC compatibil	41
(C) SISTEM DE OPERARE: PC-DOS/MS-DOS	
(D) SOFTWARE: Patent In Release # 1,0, Version # 1,30	43
(vi) DATE CURENTE PRIVIND CEREREA DE BREVET:	
(A) NUMĂRUL CERERII:	45
(B) DATA ÎNREGISTRĂRII:	
(C) CLASIFICAREA:	47
(viii) INFORMAȚII REFERITOARE LA ÎMPUTERNICIT/AGENT	
(A) NUME: Sibley, Kenneth D.	
(B) NUMĂR DE ÎNREGISTRARE: 31.665	

RO 121968 B1

- 1 (C) NUMĂR DE REFERINȚĂ/ROL:5051-338P
(ix) INFORMAȚII PRIVIND TELECOMUNICAȚIA:
3 (A) TELEFON: 919-420-2200
(B) TELEFAX: 919-881-3175
5 (2) INFORMAȚII REFERITOARE LA SECV. ID. NR. 1:
(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:
7 (A) LUNGIMEA: 1399 perechi de baze
(B) TIPUL: acid nucleic
9 (C) CATENA: mono
(D) TOPOLOGIE: lineară
11 (ii) TIPUL MOLECULEI: cADN
(ix) TRĂSĂTURĂ:
13 (A) NUME/COD: CDS
(B) LOCALIZARE: 52..1104
15 (xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECV. ID. NR: 1

1

3

5

7

11

13

15

17

19

21

23

25

27

29

31

33

35

37

RO 121968 B1

1	GGA TTA CGT TTG GTG GAT AAA TGG GCG GTA TTG ATC GGT GGG GGG AAG	633
3	Gly Leu Arg Leu Val Asp Lys Trp Ala Val Leu Ile Gly Gly Gly Lys 180 185 190	
5	AAT CAC AGA ATG GGC TTA TTT GAT ATG GTA ATG ATA AAA GAC AAT CAC	681
	Asn His Arg Met Gly Leu Phe Asp Met Val Met Ile Lys Asp Asn His 195 200 205 210	
7	ATA TCT GCT GCT GGA GGT GTC GGC AAA GCT CTA AAA TCT GTG GAT CAG	729
9	Ile Ser Ala Ala Gly Gly Val Gly Lys Ala Leu Lys Ser Val Asp Gln 215 220 225	
11	TAT TTG GAG CAA AAT AAA CTT CAA ATA GGG GTT GAG GTT GAA ACC AGG	777
	Tyr Leu Glu Gln Asn Lys Leu Gln Ile Gly Val Glu Val Glu Thr Arg 230 235 240	
13	ACA ATT GAA GAA GTA CGT GAG GTT CTA GAC TAT GCA TCT CAA ACA AAG	825
15	Thr Ile Glu Glu Val Arg Glu Val Leu Asp Tyr Ala Ser Gln Thr Lys 245 250 255	
17	ACT TCG TTG ACT AGG ATA ATG CTG GAC AAT ATG GTT GTT CCA TTA TCT	873
	Thr Ser Leu Thr Arg Ile Met Leu Asp Asn Met Val Val Pro Leu Ser 260 265 270	
19	AAC GGA GAT ATT GAT GTA TCC ATG CTT AAG GAG GCT GTA GAA TTG ATC	921
21	Asn Gly Asp Ile Asp Val Ser Met Leu Lys Glu Ala Val Glu Leu Ile 275 280 285 290	
23	AAT GGG AGG TTT GAT ACG GAG GCT TCA GGA AAT GTT ACC CTT GAA ACA	969
	Asn Gly Arg Phe Asp Thr Glu Ala Ser Gly Asn Val Thr Leu Glu Thr 295 300 305	
25	GTA CAC AAG ATT GGA CAA ACT GGT GTT ACC TAC ATT TCT AGT GGT GCC	1017
	Val His Lys Ile Gly Gln Thr Gly Val Thr Tyr Ile Ser Ser Gly Ala 310 315 320	
27	CTG ACG CAT TCC GTG AAA GCA CTT GAC ATT TCC CTG AAG ATC GAT ACA	1065
29	Leu Thr His Ser Val Lys Ala Leu Asp Ile Ser Leu Lys Ile Asp Thr 325 330 335	
31	GAG CTC GCC CTT GAA GTT GGA AGG CGT ACA AAA CGA GCA TGAGCGCCAT	1114
	Glu Leu Ala Leu Glu Val Gly Arg Arg Thr Lys Arg Ala 340 345 350	
33	TACTTCTGCT ATAGGGTTGG AGTAAAGCA GCTGAATAGC TGAAGGTGC AATAAGAAT	1174
35	CATTTTACTA GTTGTCAAAC AAAAGATCCT TCACTGTGTA ATCAACAAA AAGATGTAAA	1234
	TTGCTGGAAT ATCTCAGATG GCTCTTTTCC AACCTTATTG CTTGAGTTGG TAATTCATT	1294
37	ATAGCTTTGT TTTCATGTTT CATGGAATTT GTTACAATGA AATACITGA TTTATAAGTT	1354
39	TGGTGTATGT AAAATTCTGT GTTACTTCAA ATATTTTGAG ATGTT	1399

RO 121968 B1

(2) INFORMAȚII REFERITOARE LA SECV. ID. NR:2:	1
(i) CARACTERISTICILE SECVENȚEI:	
(A) LUNGIMEA: 351 aminoacizi	3
(B) TIPUL: aminoacid	
(C) TOPOLOGIE: lineară	5
(ii) TIPUL MOLECULEI: proteină	
(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECV. ID. NR:2	7
Met Phe Arg Ala Ile Pro Phe Thr Ala Thr Val His Pro Tyr Ala Ile 1 5 10 15	9
Thr Ala Pro Arg Leu Val Val Lys Met Ser Ala Ile Ala Thr Lys Asn 20 25 30	11
Thr Arg Val Glu Ser Leu Glu Val Lys Pro Pro Ala His Pro Thr Tyr 35 40 45	13
Asp Leu Lys Glu Val Met Lys Leu Ala Leu Ser Glu Asp Ala Gly Asn 50 55 60	15
Leu Gly Asp Val Thr Cys Lys Ala Thr Ile Pro Leu Asp Met Glu Ser 65 70 75 80	17
Asp Ala His Phe Leu Ala Lys Glu Asp Gly Ile Ile Ala Gly Ile Ala 85 90 95	19
Leu Ala Glu Met Ile Phe Ala Glu Val Asp Pro Ser Leu Lys Val Glu 100 105 110	21
Trp Tyr Val Asn Asp Gly Asp Lys Val His Lys Gly Leu Lys Phe Gly 115 120 125	23
Lys Val Gln Gly Asn Ala Tyr Asn Ile Val Ile Ala Glu Arg Val Val 130 135 140	25
Leu Asn Phe Met Gln Arg Met Ser Gly Ile Ala Thr Leu Thr Lys Glu 145 150 155 160	27
Met Ala Asp Ala Ala His Pro Ala Tyr Ile Leu Glu Thr Arg Lys Thr 165 170 175	29
Ala Pro Gly Leu Arg Leu Val Asp Lys Trp Ala Val Leu Ile Gly Gly 180 185 190	31
Gly Lys Asn His Arg Met Gly Leu Phe Asp Met Val Met Ile Lys Asp 195 200 205	33
Asn His Ile Ser Ala Ala Gly Gly Val Gly Lys Ala Leu Lys Ser Val 210 215 220	35
Asp Gln Tyr Leu Glu Gln Asn Lys Leu Gln Ile Gly Val Glu Val Glu 225 230 235 240	37

RO 121968 B1

1 Thr Arg Thr Ile Glu Glu Val Arg Glu Val Leu Asp Tyr Ala Ser Gln
 245 250 255
 3 Thr Lys Thr Ser Leu Thr Arg Ile Met Leu Asp Asn Met Val Val Pro
 260 265 270
 5 Leu Ser Asn Gly Asp Ile Asp Val Ser Met Leu Lys Glu Ala Val Glu
 275 280 285
 7 Leu Ile Asn Gly Arg Phe Asp Thr Glu Ala Ser Gly Asn Val Thr Leu
 290 295 300
 9 Glu Thr Val His Lys Ile Gly Gln Thr Gly Val Thr Tyr Ile Ser Ser
 305 310 315 320
 11 Gly Ala Leu Thr His Ser Val Lys Ala Leu Asp Ile Ser Leu Lys Ile
 325 330 335
 13 Asp Thr Glu Leu Ala Leu Glu Val Gly Arg Arg Thr Lys Arg Ala
 340 345 350
 15
 17

(2) INFORMAȚII REFERITOARE LA SECV. ID. NR:3:

(i) CARACTERISTICILE SECVENȚEI:

(A) LUNGIMEA: 1053 perechi de baze

(B) TIPUL: acid nucleic

(C) CATENĂ: mono

(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI: cADN

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV. ID. NR:3

RO 121968 B1

ATGTTTAGAG CTATTCCTTT CACTGCTACA GTGCATCCTT ATGCAATTAC AGCTCCAAGG	60	1
TTGGTGGTGA AATGTGAGC AATAGCCACC AAGAATACAA GAGTGGAGTC ATTAGAGGTG	120	3
AAACCACCAG CACACCCAC TTATGATTTA AAGGAAGTTA TGAAACTTGC ACTCTCTGAA	180	5
GATGCTGGGA ATTTAGGAGA TGTGACTTGT AAGGCGACAA TTCCTCTTGA TATGGAATCC	240	7
GATGCTCATT TTCTAGCAAA GSAAGACGGG ATCATAGCAG GAATTGCACT TGCTGAGATG	300	9
ATATTCGGGG AAGTIGATCC TJCATTAAAG GTGGAGTGGT ATGTAATGA TGGCGATAAA	360	11
GTTCATAAAG GCTTGAAATT TGGCAVAGTA CAAGGAAACG CTTACAACAT TGTATAGCT	420	13
GAGAGGGTTG TTCTCAATTT TATGCAAAGA ATGAGTGGAA TAGCTACACT AACTAAGGAA	480	15
ATGGCAGATG CTGCACACCC TGCTTACATC TTGGAGACTA GGAAACTGC TCCTGGATTA	540	17
CGTTTGGTGG ATAAATGGGC GGTATTGATC GGTGGGGGA AGAATCACAG AATGGGCTTA	600	19
TTTGATATGG TAATGATAAA AGACAATCAC ATATCTGCTG CTGGAGGTGT CGGCAAAGCT	660	21
CTAAATCTG TGGATCAGTA TTTGGAGCAA AATAAACTTC AAATAGGGGT TGAGTTGAA	720	23
ACCAGGACAA TTGAAGAAGT ACGTGAGGTT CTAGACTATG CATCTCAAC AAAGACTTCG	780	25
TTGACTAGGA TAATGCTGGA CAATATGGTT GTTCCATTAT CTAACGGAGA TATTGATGTA	840	27
TCCATGCTTA AGGAGGCTGT AGAATTGATC AATGGGAGGT TTGATACGGA GGCTTCAGGA	900	29
AATGTTACCC TTGAAACAGT ACACAAGATT GGACAACTG GTGTTACCTA CATTCTAGT	960	31
GGTGCCCTGA CGCATTCCTT GAAAGCACTT GACATTTCCC TGAAGATEGA TACAGAGCTC	1020	33
GCCCTTGAAG TTGGAAGGCG TACAAAACGA GCA	1053	35

Revendicări

1. Moleculă izolată de ADN, **caracterizată prin aceea că**, cuprinde o secvență selecționată din grupul de secvențe alcătuit din:
 - a) secvența SECV. ID Nr.:1;
 - b) secvențe de ADN care codifică o enzimă având secvența de aminoacizi din SECV. ID Nr.:2;
 - c) secvențe de ADN care au cel puțin omologie de 65% cu ADN-ul izolat de la punctele a) și b) și care codifică pentru o enzimă chinolat fosforibozil transferaza; și
 - d) secvențe de ADN care diferă de secvențele ADN de la punctele a), b) sau c) de mai sus, datorită degenerării codului genetic și care codifică pentru o enzimă chinolat fosforibozil transferaza.
2. Construct ADN, **caracterizat prin aceea că**, cuprinde, în direcția 5'-3' un promotor funcțional într-o celulă vegetală și o secvență de ADN cuprinzând o secvență codificatoare a chinolat fosforibozil transferazei conform revendicării 1, poziționată în aval față de promotorul menționat și asociată funcțional cu acesta.
3. Construct ADN, **caracterizat prin aceea că**, cuprinde, în direcția 5'-3' un promotor vegetal și o secvență de ADN cuprinzând o secvență codificatoare a chinolat fosforibozil transferazei conform revendicării 1, poziționată în aval față de promotorul menționat și asociată funcțional cu acesta, secvența ADN respectivă fiind în orientare antisens.

RO 121968 B1

4. Construct ADN, conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că**, cuprinde, în direcția 5'-3' un promotor funcțional într-o celulă vegetală și o secvență de ADN codificatoare a chinolat fosforibozil transferazei vegetale, care are secvența de nucleotidă din SECV. ID NR.:1 conform revendicării 1, ADN-ul respectiv fiind asociat funcțional cu promotorul.

5. Construct ADN, conform revendicării 3, **caracterizat prin aceea că**, cuprinde, în direcția 5'-3' un promotor funcțional într-o celulă vegetală și un ADN care codifică o chinolat fosforibozil transferază vegetală care are secvența de nucleotide din SECV ID NR.:1 conform revendicării 1, ADN-ul respectiv fiind în orientare antisens și asociat funcțional cu promotorul.

6. Construct ADN, conform revendicărilor 2, 3, 4 sau 5, **caracterizat prin aceea că** promotorul este constitutiv activ în celulele de plante.

7. Construct ADN, conform revendicărilor 2, 3, 4 sau 5, **caracterizat prin aceea că** promotorul este activ în mod selectiv în celulele țesutului radicular al plantei.

8. Construct ADN, conform oricăreia din revendicările 2-5, **caracterizat prin aceea că** promotorul este activ în mod selectiv în celulele cortexului radicular al plantei.

9. Construct ADN, conform oricăreia din revendicările 2-7, **caracterizat prin aceea că**, conține suplimentar o plasmidă.

10. Construct ADN, conform oricăreia din revendicările 2-9, **caracterizat prin aceea că** este purtat de un vector de transformare la plante.

11. Construct ADN, conform revendicării 10, **caracterizat prin aceea că** vectorul de transformare la plante este un vector de *Agrobacterium tumefaciens*.

12. Celulă de plantă, **caracterizată prin aceea că**, cuprinde un construct ADN conform oricăreia din revendicările 2-11.

13. Plantă transgenică, **caracterizată prin aceea că**, cuprinde celule de plantă definite în revendicarea 12.

14. Peptidă, **caracterizată prin aceea că**, cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID Nr.: 2.

15. Peptidă, conform revendicării 14, **caracterizată prin aceea că** este codificată de o secvență de ADN selectată din grupul de secvențe cuprinzând:

a) secvența SECV. ID Nr.:1;

b) secvențe de ADN care au cel puțin omologie de 65% cu ADN-ul izolat de la punctul a) de mai sus și care codifică pentru o enzimă chinolat fosforibozil transferaza; și

c) secvențe de ADN care diferă de secvențele ADN de la punctele a) sau b) de mai sus, datorită degenerării codului genetic și care codifică pentru o enzimă chinolat fosforibozil transferaza.

16. Procedeu de obținere a unei celule vegetale transgenice cu o expresie diminuată a chinolat fosforibozil transferazei, **caracterizat prin aceea că**, cuprinde:

- furnizarea unei celule de plantă de un tip cunoscut care să exprime chinolat fosforibozil transferaza,

- furnizarea unui construct ADN exogen, care cuprinde, în direcția 5'-3' un promotor funcțional într-o celulă vegetală și o secvență heteroloagă de ADN care conține o porțiune a secvenței care codifică ARNm al chinolat fosforibozil transferazei și este selectat din secvențele ADN definite în revendicarea 1, secvența heteroloagă de ADN fiind asociată funcțional cu promotorul respectiv și

- transformarea celulei vegetale respective cu constructul ADN menționat, pentru a produce celule transformate, respectiva celulă vegetală transformată având o expresie diminuată a QPRT-azei comparativ cu o celulă de plantă netransformată, și ADN-ul heterolog cuprinzând cel puțin 25 de nucleotide din secvența de ADN definită în revendicarea 1.

RO 121968 B1

17. Procedeu conform revendicării 16, caracterizat prin aceea că secvența heteroloagă de ADN este în orientare antisens.	1
18. Procedeu conform revendicării 16, caracterizat prin aceea că secvența heteroloagă de ADN este în orientare sens.	3
19. Procedeu conform oricăreia din revendicările 16-18, caracterizat prin aceea că celula de plantă este <i>Nicotiana tabacum</i> .	5
20. Procedeu conform oricăreia din revendicările 16-19, caracterizat prin aceea că cuprinde suplimentar regenerarea unei plante din celula vegetală transformată menționată în revendicarea 16.	7 9
21. Procedeu conform oricăreia din revendicările 16-20, caracterizat prin aceea că promotorul este un promotor constitutiv activ.	11
22. Procedeu conform oricăreia din revendicările 16-20, caracterizat prin aceea că , promotorul este activ în mod selectiv în celulele țesutului radicular al plantei.	13
23. Procedeu conform oricăreia din revendicările 16-20, caracterizat prin aceea că promotorul este activ în mod selectiv în celulele cortexului radicular al plantei.	15
24. Procedeu conform oricăreia din revendicările 16-23, caracterizat prin aceea că etapa de transformare este realizată prin bombardarea celulei vegetale menționate în revendicarea 16 cu microparticule care poartă constructul ADN menționat în revendicarea 16.	17
25. Procedeu conform oricăreia din revendicările 16-23, caracterizat prin aceea că etapa de transformare este realizată prin infectarea celulelor vegetale menționate în revendicarea 16 cu un <i>Agrobacterium tumefaciens</i> care conține o plasmidă Ti care poartă constructul ADN menționat în revendicarea 16.	19 21
26. Procedeu conform oricăreia din revendicările 16-25, caracterizat prin aceea că secvența heteroloagă de ADN cuprinde o secvență codificatoare a chinolat fosforibozil transferazei și este selectată din secvențele ADN conform revendicării 1 și este complementară cu ARNm-ul pentru chinolat fosforibozil transferază exprimat în celula vegetală menționată în revendicarea 16, într-o regiune selectată din:	23 25 27
a) secvența netranslatată de la capătul 5' al ARNm-ului pentru chinolat fosforibozil transferază ;	29
b) secvența netranslatată de la capătul 3' al ARNm-ului pentru chinolat fosforibozil transferază; și	31
c) regiunea translatată a ARNm-ului pentru chinolat fosforibozil transferază.	
27. Procedeu conform oricăreia din revendicările 16-26, caracterizat prin aceea că secvența de ADN heteroloagă cuprinde o secvență de codificare a chinolat fosforibozil transferazei și este selectată din secvențele ADN conform revendicării 1 și este complementară cu cel puțin 15 nucleotide ale ARNm-ului pentru chinolat fosforibozil transferază exprimat în celula de plantă menționată în revendicarea 16.	33 35 37
28. Procedeu conform oricăreia din revendicările 16-26, caracterizat prin aceea că secvența de ADN heteroloagă cuprinde o secvență care codifică chinolat fosforibozil transferaza și este selectată din secvențele ADN conform revendicării 1 și este complementară cu cel puțin 200 nucleotide ale ARNm-ului pentru chinolat fosforibozil transferază exprimat în celula de plantă menționată în revendicarea 16.	39 41
29. Procedeu conform oricăreia din revendicările 16-25, caracterizat prin aceea că secvența de ADN heteroloagă cuprinde secvența de nucleotidă care codifică chinolat fosforibozil transferaza, din SECV. ID Nr.: 1, conform revendicării 1.	43 45
30. Plantă transgenică din genul <i>Nicotiana</i> având diminuată expresia chinolat fosforibozil transferazei comparativ cu o plantă de control netransformată, caracterizată prin aceea că , cuprinde celule de plantă transgenică care conțin:	47

1 a) un construct ADN exogen care cuprinde, în direcția 5'-3', un promotor funcțional
în celula vegetală menționată și o secvență ADN heteroloagă care cuprinde un segment al
3 unei secvențe ADN ce codifică un ARNm al chinolat fosforibozil transferazei vegetale, se-
lectat din secvențele ADN conform revendicării 1, ADN-ul respectiv fiind asociat funcțional
5 cu promotorul;

b) planta prezentând o expresie redusă a chinolat fosforibozil transferazei comparativ
7 cu o plantă martor netransformată, și ADN-ul heterolog cuprinzând cel puțin 25 de nucleotide
ale unei secvențe ADN conform revendicării 1.

9 31. Plantă conform revendicării 30, **caracterizată prin aceea că** secvența
heteroloagă de ADN este în orientare antisens.

11 32. Plantă conform revendicării 30, **caracterizată prin aceea că** secvența
heteroloagă de ADN este în orientare sens.

13 33. Plantă transgenică din genul *Nicotiana*, având o expresie diminuată a chinolat
fosforibozil transferazei comparativ cu o plantă martor netransformată, **caracterizată prin**
15 **aceea că** este un descendent al plantei conform revendicării 30.

17 34. Procedeu de reducere a expresiei genei pentru chinolat fosforibozil transferaza
într-o celulă vegetală, **caracterizat prin aceea că**, cuprinde:

- creșterea unei celule vegetale transformate să conțină o secvență heteroloagă de
19 ADN selectată din secvențele ADN conform revendicării 1, în care o catenă transcrisă a
respectivei secvențe heteroloage de ADN este complementară cu ARNm pentru chinolat
21 fosforibozil transferaza endogen la celula menționată, în care transcrierea respectivei catene
complementare reduce expresia genei chinolat fosforibozil transferazei.

23 35. Procedeu de obținere a unei plante de tutun cu nivele scăzute de nicotină în
frunze, **caracterizat prin aceea că**, cuprinde:

25 - creșterea unei plante de tutun sau a unui descendent al acesteia, în care respectiva
plantă cuprinde celulele conținând un construct ADN exogen, cuprinzând o regiune de
27 inițiere a transcrierii, funcțională în planta menționată și o secvență de ADN heteroloagă,
selectată din secvențele ADN conform revendicării 1, legate funcțional la regiunea de inițiere
29 a transcrierii amintită, în care catena transcrisă a secvenței heteroloagă de ADN menționată
este complementară cu ARNm endogen pentru chinolat fosforibozil transferază în celulele
31 respective.

33 36. Procedeu de obținere a unei celule de plantă transgenică cu nivel crescut al
expresiei chinolat fosforibozil transferazei, **caracterizat prin aceea că**, cuprinde:

35 - furnizarea unei celule de plantă de un tip cunoscut pentru a exprima chinolat
fosforibozil transferaza;

37 - furnizarea unui construct ADN exogen, care să conțină, în direcția 5'-3', un promotor
funcțional într-o celulă vegetală și o secvență ADN heteroloagă care codifică pentru chinolat
fosforibozil transferaza și este selectată din secvențele ADN conform revendicării 1, secvența
39 de ADN heteroloagă fiind asociată funcțional cu promotorul respectiv;

41 - transformarea celulei vegetale menționate cu constructul de ADN menționat pentru
a produce o celulă vegetală transformată, celula vegetală transformată respectivă având o
expresie crescută a chinolat fosforibozil transferazei comparativ cu o celulă vegetală ne-
43 transformată.

45 37. Plantă transgenică din genul *Nicotiana* având o expresie crescută a chinolat
fosforibozil transferazei comparativ cu o plantă martor netransformată, **caracterizată prin**
aceea că, cuprinde celule de plantă transgenică care conțin:

RO 121968 B1

- a) un construct ADN exogen care cuprinde, în direcția 5'-3', un promotor funcțional în celula vegetală menționată și o secvență heteroloagă de ADN care codifică o chinolat fosforibozil transferază vegetală selectată dintre secvențele ADN definite în revendicarea 1, ADN-ul heterolog respectiv fiind funcțional asociat cu promotorul menționat; 1 3
- b) planta având o expresie crescută a chinolat fosforibozil transferazei și prin urmare nivele crescute de nicotină în frunze, față de o plantă martor netransformată. 5
38. Celulă de plantă transgenică din genul *Nicotiana* având o expresie crescută a chinolat fosforibozil transferazei comparativ cu o celulă de plantă netransformată, **caracterizată prin aceea că** este un descendent al unei plantei conform revendicării 37. 7 9
39. Procedeu pentru creșterea expresiei genei chinolat fosforibozil transferazei într-o celulă de plantă, **caracterizat prin aceea că**, cuprinde: 11
- creșterea unei celule vegetale transformată pentru a conține un ADN exogen selectat dintre secvențele de ADN conform revendicării 1, în care ADN-ul exogen codifică pentru chinolat fosforibozil transferază. 13
40. Procedeu conform revendicării 39, **caracterizat prin aceea că**, celula vegetală transformată se obține prin procedeul care cuprinde: 15
- integrarea în genomul unei celule vegetale gazdă a unui construct exogen de ADN care cuprinde, în direcția transcrierii, un promotor funcțional în celula vegetală menționată, o secvență heteroloagă de ADN care codifică pentru chinolat fosforibozil transferază funcțională în celula menționată și este selectată dintre secvențele de ADN conform revendicării 1, secvența heteroloagă de ADN fiind asociată funcțional la promotorul menționat și o regiune de terminare a transcrierii, funcțională în celula menționată, prin aceasta obținându-se o celulă vegetală transformată. 17 19 21 23
41. Procedeu de obținere a unei plante de tutun cu nivele crescute de nicotină în frunze, **caracterizat prin aceea că**, cuprinde: 25
- creșterea unei plante de tutun sau a unui descendent al acesteia, în care planta respectivă cuprinde celule conținând un construct ADN exogen cuprinzând o transcriere funcțională a regiunii de inițiere în planta menționată și o secvență heteroloagă de ADN, selectată dintre secvențele ADN conform revendicării 1, legate funcțional la regiunea menționată de inițiere a transcrierii, în care secvența heteroloagă de ADN menționată codifică pentru chinolat fosforibozil transferaza funcțională în celulele respective. 27 29 31
42. Plantă transgenică conform revendicărilor 30, 33 sau 37 sau celula de plantă transgenică conform revendicării 38, în care genul *Nicotiana* cuprinde *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana rustica* și *Nicotiana glutinosa*. 33
43. Utilizarea unei celule de plantă de tutun conform revendicării 12 pentru fabricarea unui produs de tutun cu un conținut mai scăzut de nicotină. 35
44. Utilizarea unei celule de plantă de tutun conform revendicărilor 30-33 pentru fabricarea unui produs de tutun cu un conținut mai scăzut de nicotină. 37
45. Utilizarea unei celule de plantă de tutun conform revendicării 38 pentru fabricarea unui produs de tutun cu un conținut crescut de nicotină. 39
46. Utilizarea unei celule de plantă de tutun conform revendicării 37 pentru fabricarea unui produs de tutun cu un conținut crescut de nicotină. 41

(51) Int.Cl.

C12N 15/54(2006.01);

C12N 15/82 (2006.01);

C12N 15/70 (2006.01);

C12N 15/11 (2006.01);

C12N 9/10 (2006.01);

A01H 5/00 (2006.01)

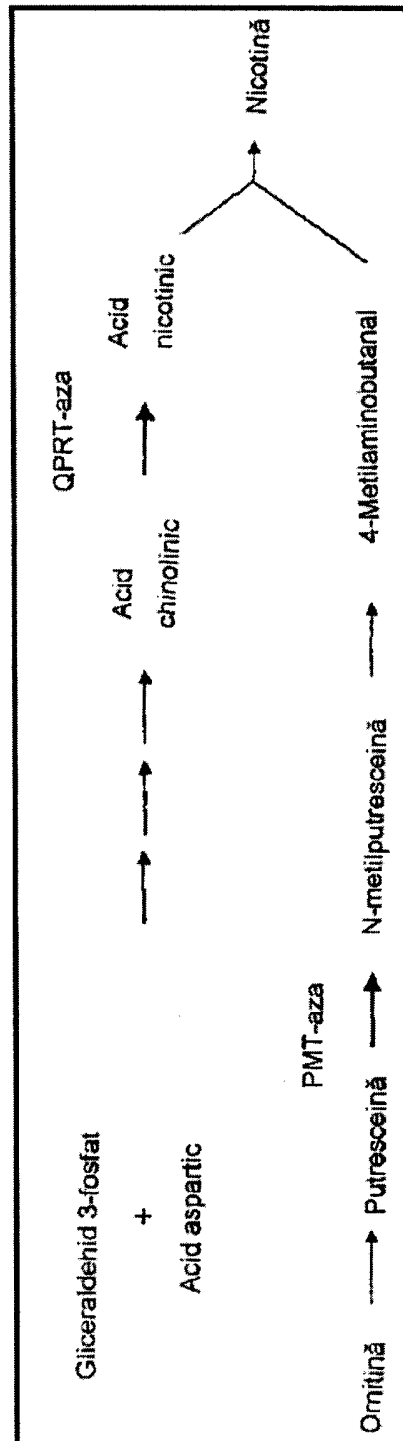


Fig. 1

RO 121968 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/54(2006.01);
C12N 15/82 (2006.01);
C12N 15/70 (2006.01);
C12N 15/11 (2006.01);
C12N 9/10 (2006.01);
A01H 5/00 (2006.01)

```

caaaaactat ttccacaaa attcatttca caaccccccc aaaaaaaaac cATGTTTAGA 60
GCTATTCCTT TCACTGCTAC AGTGCATCCT TATGCAATTA CAGCTCCAAG GTTGGTGGTG 120
AAAATGTCAG CAATAGCCAC CAAGAATACA AGAGTGGAGT CATTAGAGGT GAAACCACCA 180
GCACACCCAA CTTATGATTT AAAGGAAGTT ATGAAACTTG CACTCTCTGA AGATGCTGGG 240
TTTCTAGCAA AGGAAGACGG GATCATAGCA GGAATTGCAC TTGCTGAGAT GATATTCGGG 360
GAAGTTGATC CTTCAATAAA GGTGGAGTGG TATGTAAATG ATGGCGATAA AGTTCATAAA 420
GGCTTGAAT TTGGCAAAGT ACAAGGAAAC GCTTACAACA TTGTTATAGC TGAGAGGGTT 480
GTTCTCAATT TTATGCAAAG AATGAGTGGG ATAGCTACAC TAACTAAGGA AATGGCAGAT 540
GCTGCACACC CTGCTTACAT CTTGGAGACT AGGAAACTG CTCCTGGATT ACGTTTGGTG 600
GATAAATGGG CGGTATTGAT CGGTGGGGGG AAGAATCACA GAATGGGCTT ATTTGATATG 660
GTAATGATAA AAGACAATCA CATATCTGCT GCTGGAGGTG TCGGCAAAGC TCTAAATCT 720
GTGGATCAGT ATTTGGAGCA AAATAAACTT CAAATAGGGG TTGAGGTTGA AACCAGGACA 780
ATTGAAGAAG TACGTGAGGT TCTAGACTAT GCATCTCAAA CAAAGACTTC GTTGACTAGG 840
ATAATGCTGG ACAATATGGT TGTTCCATTA TCTAACGGAG ATATTGATGT ATCCATGCTT 900
AAGGAGGCTG TAGAATTGAT CAATGGGAGG TTTGATACGG AGGCTTCAGG AAATGTTACC 960
CTTGAAACAG TACACAAGAT TGGACAACT GGTGTTACCT ACATTCTAG TGGTGCCTTG 1020
ACGCATTCCG TGAAAGCACT TGACATTTCC CTGAAGATCG ATACAGAGCT CGCCCTTGAA 1080
GTTGGAAGGC GTACAAAACG AGCATGAgcg ccattacttc tgctataggg ttggagtaaa 1140
agcagctgaa tagctgaaag gtgcaaataa gaatcatttt actagtgtgc aaacaaaaga 1200
tccttacttg tgtaatcaaa caaaaagatg taaattgctg gaatatctca gatggctctt 1260
ttccaacctt attgcttgag ttggtaattt cattatagct ttgttttcat gtttcatgga 1320
atltgttaca atgaaaatac ttgatttata agtttggtgt atgtaaaatt ctgtgttact 1380
tcaaatattt tgagatgtt 1399

```

Fig. 2A

```

MFRAIPFTAT VHPYAITAPR LYVKMSAIAT KNTRVESLEV KPPAHPTYDL 50
KEVMKLALSE DAGNLGDVTC KATIPLDMES DAHFLAKEDG IIAGIALAEM 100
IFAEVOPSLK VEHYVNOGDK VHKGLKFGKV QGNAYNIVIA ERVVLNFMQR 150
MSGIATLTKE MADAHPAYI LETRKTAPGL RLVDKNAVLI GGGKNHRMGL 200
FDMVMIKDNH ISAAGGVGKA LKSVDQYLEQ NKLOIGVEVE TRTIEEVREV 250
LDYASQTKTS LTRIMLDNMV VPLSNGDIDV SMLKEAVELI NGRFDTEASG 300
NVTLETVHKI GQTGVTYISS GALTHSVKAL DISLKIDTEL ALEVGRRTKR 350
A 351

```

Fig. 2B

RO 121968 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/54(2006.01);

C12N 15/82 (2006.01);

C12N 15/70 (2006.01);

C12N 15/11 (2006.01);

C12N 9/10 (2006.01);

A01H 5/00 (2006.01)

N. tabacum	MFRAIPFTATVHPYAITAPRLVVKMSAIA TKNTRVESLEV KPPAHPTYDL
R. rubrum	*-----RPNH-----PVAALS*F----AI
M. leprae	*-----LSDC-----EFDAAR-----
S. typhimurium	*-----PPRR*NPDR*-----DALL*RINLDI*A----AV
E. coli	*-----PPRR*NPDR*-----DELL*RINLDI*G----AV
H. sapien	*-----D*EG*ALLLPVTLAALVDSWLREDC*G-----
S. cerevisiae	*-----PVYE-HLLPVNGANRQDVTNWLSEDEV*S-----
N. tabacum	KEYMKLALSEDAGNLGDOVTCKATIPLOMESDAHFLAKEDGIIAGIA----
R. rubrum	D*AVRR**A**L*RA**I*ST****AATRAH*RFV*ROP**L**LGCA--
M. leprae	-DTIRR**H**LRYGL*I*TD**V*AGTVVTGSMVPR*P*VIAGVGVALL
S. typhimurium	AQALREDLGGEVDAGN*I*AQL-L*A*TOAH*TVITR*D*VF----CGKR
E. coli	AQALREDLGGTVDANN*I*A*L-L*ENSR*H*TVITR*N*VF----CGKR
H. sapien	-----LNYMALVSGAGP*QALWAKSP*VL----AGQP
S. cerevisiae	-----FDGGYVVGSDLK EANLYCKQD*ML----CGVP
N. tabacum	-LAENIFAEVPSLKVEWYVNDGDKVHKGLK-----FGKVGGNAYNIVI
R. rubrum	--RSAF-ALLDQTVTFTTIPLE**AEIAA*QT-----VAE*A*A*RT*LA
M. leprae	VLD*VF-GVGYRVLY--R*E**ARLQS*QP-----LLTVQAA*RGLLT
S. typhimurium	WVE*VFIQLAGDDVRLT*H*D***AI*ANQT-----VFELN*PARVLLT
E. coli	WVE*VFIQLAGDDVTII*H*D***VINANQS-----LFELE*PSRVLLT
H. sapien	FFDAIFTQL---NQVS*FLPE*S*LVPVAR-----VAEVR*P*HDLL
S. cerevisiae	FAW*VFNQ---ELQVE*LFKE*SFLEPSKNDGKIVVAKIT*P*K**LL
N. tabacum	AERVVLNFMQRMGSIATLT XEMAD--AAH--PAYILETRKTAPGLRLVDK
R. rubrum	***TA***LGH*****R*RRFG*AI*HT--R*RLTC***T***GLE*
M. leprae	***TV***VCH*****V*VAWV*AVRGT--K*KIRD***L***ALQ*
S. typhimurium	G**TA***V*TL**VASEVRRYVGLL*GT--QTQL*D****L***TAL*
E. coli	G*PTA***V*TL**VASKVRHYVELLEGT--NTQL*D****L***SAL*
H. sapien	G***A***TLARC***SAAAAVEAARGAGWGHVAG****T**F***E*
S. cerevisiae	***TA**ILSR*****TASHKII SLARSTGYKGTIAG****T***RLE*
N. tabacum	WAVLIGGGKNHRMGLFDMVMIXDNHISAAGGVGKALKSVDOYLEQNKLQI
R. rubrum	Y**RC***S***F**D*A*L*****AVA***SA***SRAR-AGVGHMVRI
M. leprae	Y**RV***V***L**G*TAL*****VA*V*S*VD**RA*R-AAPEL-PC
S. typhimurium	Y***C***A***L**T*AFL*****I*S*S*RQ*VEKAF-W*HPD-APV
E. coli	Y***C***A***L**S*AFL*****I*S*S*RQ*VEKAS-W*HPD-APV
H. sapien	YGL*V**AAS**YD*GGLVNL*D**VVP**E*K*VRAARQ---AADFAL
S. cerevisiae	YSH*V**CDT**YD*SS**ML*D***W*T*STN*V*NARA---VGGFAV

Fig. 3

RO 121968 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/54(2006.01);
C12N 15/82 (2006.01);
C12N 15/70 (2006.01);
C12N 15/11 (2006.01);
C12N 9/10 (2006.01);
A01H 5/00 (2006.01)

N. tabacum	GVEVETRTIEEVREVL DYASQTKTSLTRIMLDNMVPLSNGDIDVSNLKE
R. rubrum	EI****--L*QLA***AVGGAEV-----VL****-----DAPT----*TR
M. leprae	E****S--L*QLDAM*A-EEPEL-----*L***F--*VWQTOV----AVQ
S. typhimurium	E****N--LDELDDA*K-*GADI-----*****F-----NTDQ----MR*
E. coli	E****N--L**LD*A*K-*GADI-----*****F-----ETEQ----MR*
H. sapien	K****CSSLQ**VQAAE-*GADL-----VL***F-----KPEELHPTAT
S. cerevisiae	KI***CLSED*AT*AIE-*GADY-----*****F-----KGDGLK*CAQ

N. tabacum	AVELI---NGRFDTEASGNVTLETVHKIG-QTGVTYISSGALTHSVKALD
R. rubrum	**DMV---A**LY*****G*S*D*IAALA-ES**C***V*****TT**
M. leprae	RRDIR---APT VLL*S**GLS**NAATYA-G***CYLAV*****RI**
S. typhimurium	**KRV---**QARL*V*****AE*LREFA-E***DF**V*****R***
E. coli	**KRT---**KALL*V*****DK*LREFA-E***DF**V*****Q***
H. sapien	*LKAQFPSVA---VEA**GIT*DNLPQF-CGPHIDV**M**M**QA*P***
S. cerevisiae	SLKNKNGKKHFLLEC**GLN*DNLEEYLCD-DIDY*Y*TSSIHQGTPVI*

		<u>%identitate</u>	<u>%similaritate</u>
N. tabacum	ISKLIIDTELALVGRRTKRA		
R. rubrum	*G*D*VVA-----PPKAERA	15.9	43.2
M. leprae	*G*DL	18.3	37.3
S. typhimurium	LSMRFC	19.2	34.8
E. coli	LSMRFR	17.9	32.8
H. sapien	F***L---F*K*VAPVP*IH	16.8	31.7
S. cerevisiae	F***LAH	14.6	27.8

Fig. 3 continuare

(51) Int.Cl.

C12N 15/54(2006.01);

C12N 15/82 (2006.01);

C12N 15/70 (2006.01);

C12N 15/11 (2006.01);

C12N 9/10 (2006.01);

A01H 5/00 (2006.01)

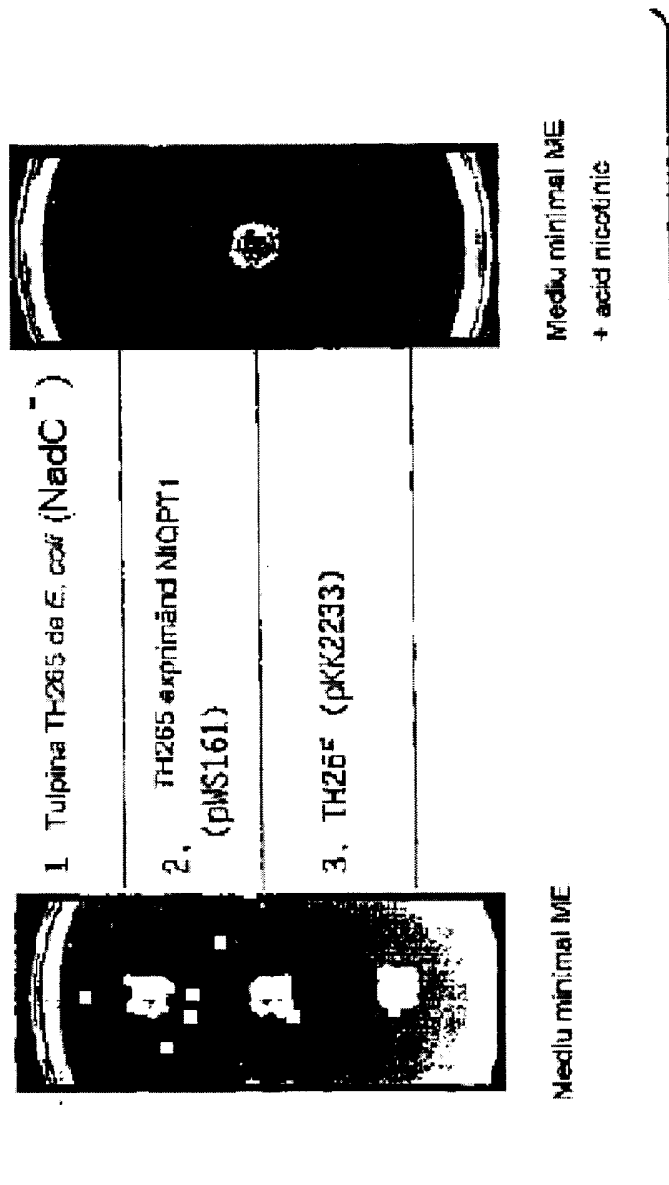


Fig. 4

RO 121968 B1

(51) Int.Cl.

C12N 15/54(2006.01);

C12N 15/82 (2006.01);

C12N 15/70 (2006.01);

C12N 15/11 (2006.01);

C12N 9/10 (2006.01);

A01H 5/00 (2006.01)

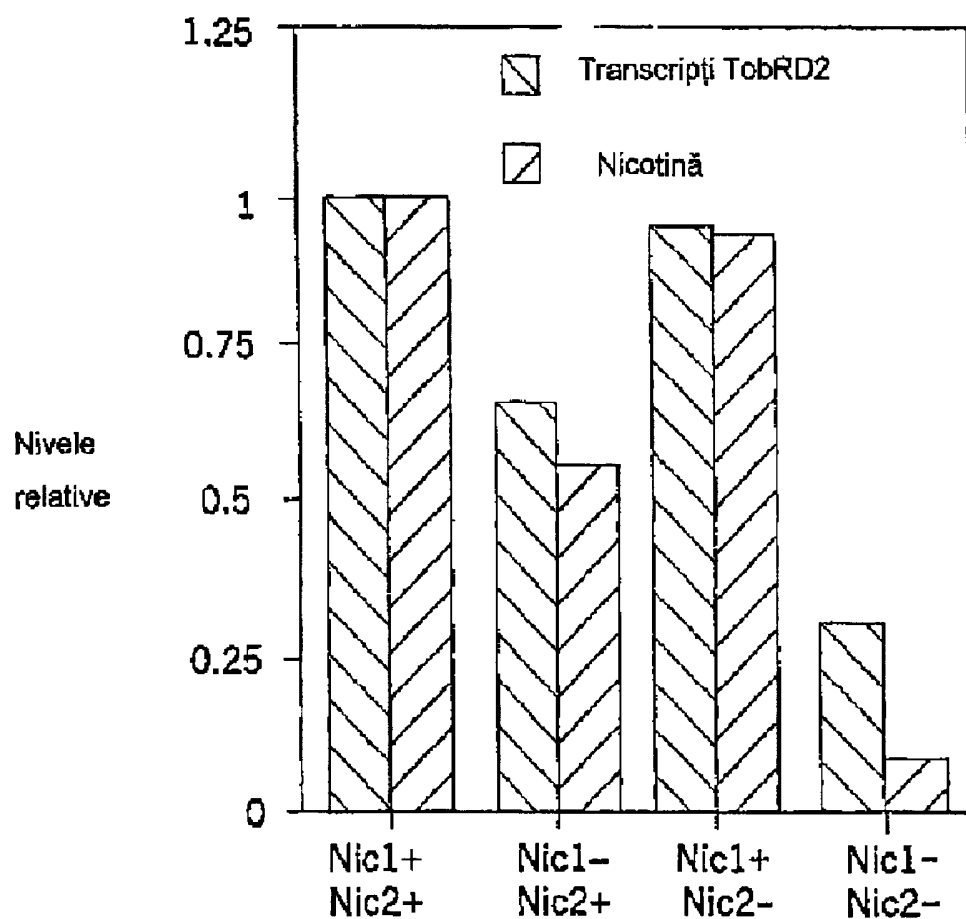


Fig. 5

(51) Int.Cl.

C12N 15/54(2006.01);

C12N 15/82 (2006.01);

C12N 15/70 (2006.01);

C12N 15/11 (2006.01);

C12N 9/10 (2006.01);

A01H 5/00 (2006.01)

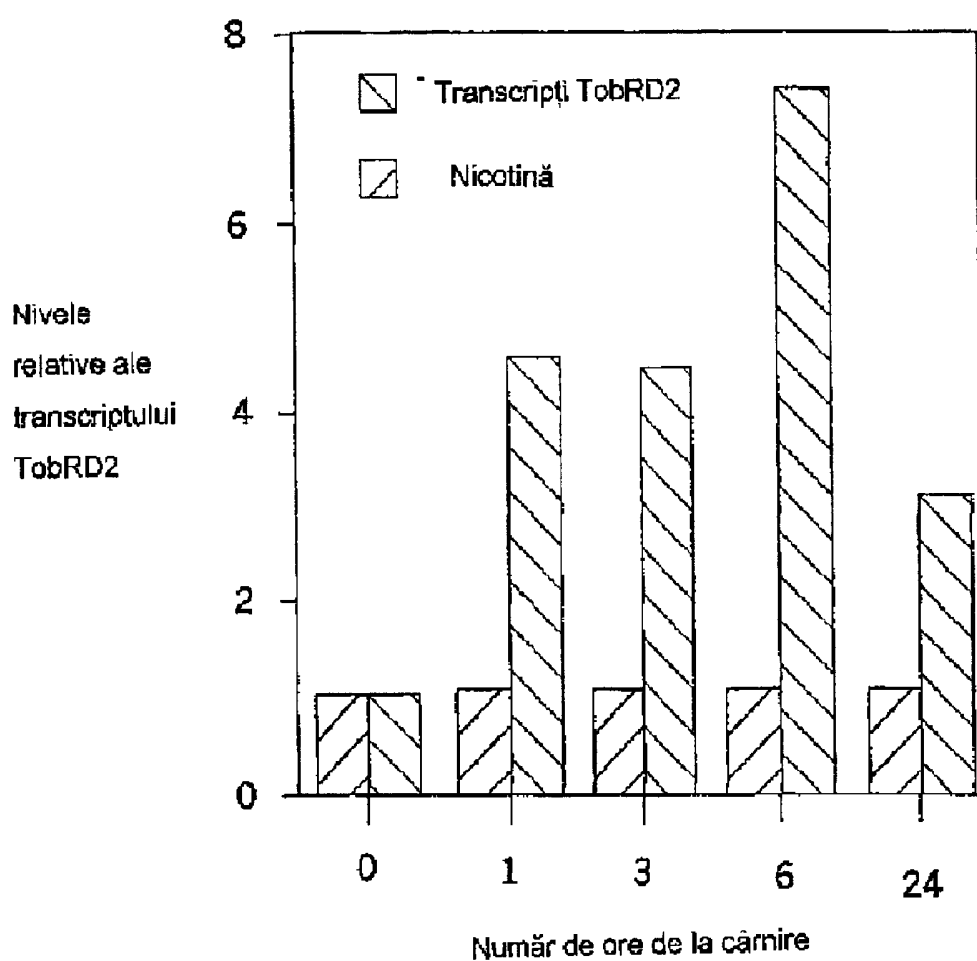


Fig. 6



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci