PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **20.02.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **21.02.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/9703681**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.02.2000**
(Věstník č. 2/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/GB98/00542**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO98/37211**

(21) Číslo dokumentu:
1999 - 2976

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7]:
C 12 N 15/82
C 12 N 9/22
C 12 Q 1/68
A 01 H 5/00

(71) Přihlašovatel:
GENE SHEARS PTY. LIMITED,
North Ryde, AU;

(72) Původce:
Paul Wyatt, Cambridge, GB;
Perez Pascual, Aubiere, FR;
Huttner Eric, Evry, FR;
Betzner Andreas Stefan, Canberra, AU;

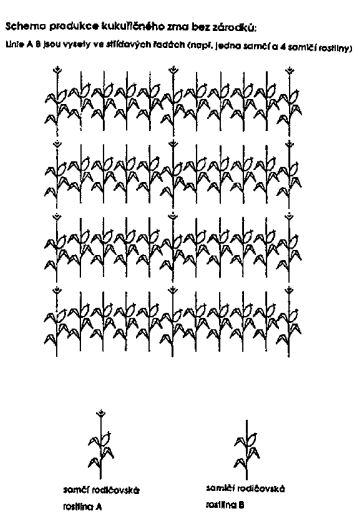
(74) Zástupce:
Všetečka Miloš JUDr., Hálkova 2, Praha 2,
120 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Komplementace proteinů v transgenních rostlinách

(57) Anotace:

Řešení se týká dvojic rodičovských rostlin pro produkci hybridního osiva a způsobů přípravy rostlin s požadovaným fenotypem. Požadovaným fenotypem je aktivní enzym, regulační protein nebo protein, který ovlivňuje funkčnost a/nebo životaschopnost a/nebo strukturní integritu buňky. Výhodně je požadovaný fenotyp v podstatě nepřítomen v rodičovských rostlinách/liniích. Předkládaný vynález se konkrétně týká rodičovských rostlin a způsobů obsahujících rostlinné linie pro produkci rostlin se samčí sterilitou a osiva.



CZ 1999 - 2976 A3

23.09.99
PV 2976-99
65909

Komplementace proteinů v transgenních rostlinách

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká dvojic rodičovských rostlin pro produkci hybridního osiva a způsobů přípravy rostlin s požadovaným fenotypem. Požadovaným fenotypem je aktivní enzym, regulační protein nebo protein, který ovlivňuje funkčnost a/nebo životaschopnost a/nebo strukturní integritu buňky. Požadovaný fenotyp je výhodně v podstatě nepřítomen v rodičovských rostlinách/liniích. Předkládaný vynález se konkrétně týká rodičovských rostlin a způsobů obsahujících rostlinné linie pro produkci rostlin se samčí sterilitou a osiva.

Předkládaný vynález popisuje systém komplementace proteinů, který má řadu možných způsobů použití. Systém je možné vysvětlit a demonstrovat pomocí příkladů týkajících se přípravy rostlin se samčí sterilitou a semen bez embryí, ačkoliv vynález není omezen pouze na tato použití.

Dosavadní stav techniky

Použití dominantní umělé samčí sterility (AMS) v rostlinách je popsáno v dokumentu WO95/20668. Tento dokument popisuje binární systém, který užívá dvou genů, které společně (ale nikoliv každý samostatně) způsobují samčí sterilitu. Tyto geny jsou spojeny křížením rostlin, přičemž každá z rodičovských rostlin je homozygotní pro daný gen, což vede ke vzniku homogenní populace rostlin se samčí sterilitou. Dokument WO95/20668 popisuje několik způsobů, jak implementovat genový binární systém, včetně následujících způsobů:

I) Systém založený na aktivaci transkripce: Transkripčně inaktivní gen AMS je aktivován po křížení tím, že je poskytnut odpovídající transkripční faktor

II) Systém založený na aktivaci sestřihu: Gen AMS inaktivovaný přítomností intronu je aktivován po křížení tím, že je poskytnuta odpovídající maturáza

III) Systém založený na supresi stop-kodonu během translace: Gen AMS inaktivovaný vložením umělého stop-kodonu do ORF je aktivován po křížení tím, že je poskytnuta umělá supresorová tRNA pro vložený stop-kodon.

IV) Systém založený na sekvenčně specifické genové inaktivaci: Jeden z rodičů obsahuje modifikovaný gen samčí fertility a transgen, který inaktivuje pouze nemodifikovaný gen samčí fertility. Druhý rodič obsahuje transgen, který inaktivuje pouze modifikovaný gen samčí fertility. V hybridovi je pak inaktivován jak modifikovaný tak i nemodifikovaný gen samčí fertility, což způsobuje samčí sterilitu.

V) Systém založený na zabránění obnovy samčí fertility obnovitelským genem: První rodič obsahuje gen AMS a obnovitelský gen a druhý rodič obsahuje gen inhibující účinek obnovitelského genu.

Avšak výše popsaný binární systém se ukázal být příliš složitým pro implementaci a projevila se u něho řada komplikací.

Tak např. bylo zjištěno, že použití supresorové tRNA (popsali Betzner et al., 1996, Abstract of the 14th International Congress of Plant Reproduction, Lorne, Australia) může mít škodlivé následky u některých rostlinných druhů. To sice nevylučuje použití tohoto systému, ale výběr transgenních rostlin je tak mnohem pracnější než je žádoucí. Dalším příkladem je "propustnost" promotoru T7 (popsaného v dokumentu EP-A-0589841) . Některé rostliny transformované konstruktem, kde je barnáza řízena promotorem T7, byly sterilní při absenci T7 RNA polymerázy. Ani

toto zcela nevylučuje použití takového systému, ale činí obtížným identifikovat vhodné transgenní rostliny. Navíc genový binární systém u některých rostlin není nejlepší, neboť zatím všechny potřebné genetické prvky nejsou dostatečně dobře charakterizovány.

V dosavadním stavu techniky lze najít dvě cesty, které vedly k fenotypu, který byl do rostliny vnesen kombinací dvou proteinů. V r. 1989 Hiatt a spolupracovníci (Nature 342, s. 76-78) popsali produkci funkční protilátky v tabáku křížením tabákových rostlin exprimujících imunoglobulinový gen gama a imunoglobulinový gen kapa.

Avšak v tomto systému se objevil problém. Jelikož lehký a těžký řetězec protilátky jsou spojeny disulfidickými můstky, tyto můstky se nevytvořili v redukujícím prostředí cytoplasmy. Sestavení funkční protilátky v rostlině tedy vyžaduje, aby oba řetězce byly nasměrovány do endoplasmatického retikula a pak secernovány do apoplastu (mezibuněčného prostoru). Produkce protilátek v rostlinách je tak omezena na produkci secernovaných protilátek nebo na produkci jednotlivých řetězců protilátek.

V r. 1992 Lloyd a spolupracovníci (Science, 258, str. 1773-1775) popsali přenos dvou genů kukuřice, které kódovaly transkripční faktory R a C1, do *Arabidopsis* a tabáku. Ektopická exprese těchto genů samostatně v heterologních rostlinách projevovala určitý účinek na transkripci endogenních genů. Geny projevovaly účinek zvláště samostatně, což vylučuje jejich použití pro požadovaný účel. Koexprese (současná exprese) těchto dvou genů měla výraznější kvalitativní a kvantitativní účinek, než exprese každého genu samostatně. Avšak tyto geny mají vlastnosti, které velmi omezují jejich možnou užitečnost a z výše citovaného článku vyplývá, že nejsou obecně využitelné.

Bylo ukázáno, že transkripční faktory "Apetala 3" a "Pistillata" z *Arabidopsis thaliana* mohou být ektopicky koexprimovány a spojené v souladu vytvářejí nový fenotyp květu *Arabidopsis* (Krizek a Meyerowitz,

1996, Development 122, s. 11-22). Omezení popsaná výše pro proteiny R/C1 platí však také v tomto případě.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález popisuje komplementační systém, který odstraňuje mnoho problémů a potíží spojených s dosud známými genovými binárními systémy. Proteinový komplementační systém podle předkládaného vynálezu je založen na expresi dvou nebo více genových sekvencí v jediné rostlině, přičemž tyto polypeptidy/proteiny asociují, interagují nebo jinak společně vytvářejí aktivní enzym, regulační protein nebo protein, který ovlivňuje funkčnost a/nebo životaschopnost a/nebo strukturní integritu buňky. Dále v tomto textu tedy všechny odkazy na protein, který ovlivňuje strukturní integritu buňky popisují protein, který může, navíc nebo alternativně, ovlivňovat funkčnost a/nebo životaschopnost buňky. Některé polypeptidy/proteiny mohou patřit do více než jedné z těchto kategorií. Žádná z jednotlivých genových sekvencí přítomná v dané rostlině nevede sama k fenotypovému účinku v těchto rostlinách.

Předkládaný vynález popisuje vytvoření rostliny, která má požadovaný fenotyp tím, že exprimuje aktivní enzym, regulační protein nebo protein, který ovlivňuje strukturní integritu buňky (např. protein destabilizující membránu). Rostlina se může získat tak, že se kříží dvojice rodičovských rostlin a a b. Rostlina a obsahuje jednu nebo více genových sekvencí, které kódují polypeptid(y) nebo protein(y) (A) s nízkou nebo žádnou aktivitou, takže požadovaný fenotyp není významně (nebo podstatně) důsledkem exprese jednoho nebo několika genů a samotných. Rostlina b obsahuje také jednu nebo více genových sekvencí, které kódují polypeptid(y) nebo protein(y) (B) taktéž s nízkou nebo žádnou aktivitou,

takže požadovaný fenotyp není významně (nebo podstatně) důsledkem exprese jednoho nebo několika genů b samotných. Když se rostliny a a b zkříží, výsledný hybrid exprimuje oba polypeptidy a/nebo proteiny A a B. Tyto dva polypeptidy/proteiny asociují, interagují nebo jinak společně vytvářejí aktivní enzym, regulační protein nebo protein, který ovlivňuje strukturní integritu buňky s tím výsledkem, že dceřinná rostlina má požadovaný fenotyp. Poznámka: Dále v textu budou pro jednoduchost polypeptidy/proteiny A a B označovány pouze jako "polypeptidy".

Proteinový komplementační binární systém podle předkládaného vynálezu je jednodušší než dřívější binární systémy, neboť odpadá potřeba interakce mezi geny, nevyžaduje se modifikace exprese genů ani modifikace úrovně exprese polypeptidů v dceřinných rostlinách ve srovnání s rodičovskými rostlinami.

Přehled obrázků

Popis předkládaného vynálezu je doprovázen následujícím obrázky:

Obr. 1A: Sekvence kódující barnázu

Obr. 1B: Mezigenová sekvence

Obr. 1C: Sekvence kódující "barstar"

Obr. 1D: Translační fúze ORF polypeptidu A**/(Gly4Ser)3 spojovací peptid/GUS

Obr. 1E: Nukleotidová sekvence translační fúze ubichitinové genomové sekvence a ORF peptidu A***

Obr. 1F: Nukleotidová sekvence translační fúze ubichitinové genomové sekvence a ORF peptidu B***

Obr. 1G: DNA sekvence primerů pro IPCR (inverzní polymerázovou řetězovou reakci) (příklad 1)

Obr. 2: Schéma konstrukce pepA* a pepB* pomocí inverzní PCR (IPCR)

Obr. 3A: *In vitro* konstrukce S-peptidu, S(+5)-proteinu a S-proteinu ze syntetických oligonukleotidů

Obr. 3B: *In vitro* konstrukce sekvence kódující S-peptid a spojovací sekvenci - linker (Gly4-Ser)3 ze syntetických oligonukleotidů

Obr. 4A: Proteinová a DNA sekvence S-peptidu a S-peptidu se spojovací sekvencí (Gly4-Ser)3

Obr. 4B: Proteinová a DNA sekvence S(+5)-proteinu a S-proteinu

Obr. 4C:

I) Produkt PCR amplifikace kódující částečný zaměřovací signál AOX3,

II) ORF kódující zaměřovací sekvenci AOX3 (podtržena) a S-peptid,

III) ORF kódující zaměřovací sekvenci AOX3 (podtržena) a S-peptid/(Gly4-Ser)3/GUS,

IV) ORF kódující zaměřovací sekvenci AOX3 (podtržena) a S-protein,

V) Translační fúze ubichitinové genomové sekvence a ORF S-proteinu

Obr. 4D: Nukleotidová sekvence primerů IPCR (příklad 3)

Obr. 5: Produkční schéma kukuřičného zrna bez embryí.

Bezzárodková semena sklizená pouze ze samičích řad = 100 % bezzárodkových semen nebo semena sklizená ze všech rostlin na poli = přibližně 80 % bezzárodkových semen kukuřice: Jestliže je vhodný tento způsob sklizně semen, je žádoucí a možné náhodné setí s 10 % samčích a 90 % samičích rostlin.

Legenda: samčí rodičovská rostlina A, exprimující v embryu pepA*, genotyp emb-pepeA*/emb-pepA* nebo emb-pepA* spojený s rezistencí k herbicidu/emb-pepA* spojený s rezistencí k herbicidu

samičí rodičovská rostlina B, exprimující v embryu jen pepB*, genotyp emb-pepB*/ emb-pepB* na pozadí cytoplazmatické samčí sterility nebo

emb-pepeB*/emb-pepB* umělá samčí sterilita spojená s rezistencí k herbicidu/+

První aspekt předkládaného vynálezu poskytuje dvojici rodičovských rostlin pro produkci semen (osiva), který obsahuje:

I) první rodičovskou rostlinu, obsahující jednu nebo několik genových sekvencí kódujících polypeptid A, a

II) druhou rodičovskou rostlinu, obsahující jednu nebo několik genových sekvencí kódující polypeptid B,

přičemž polypeptidy A a B, pokud se exprimují samostatně v různých rostlinách, nevytvářejí aktivní enzym, regulační protein ani jiný protein, který ovlivňuje strukturní integritu buňky. Přítomnost aktivního enzymu, regulačního proteinu nebo proteinu, který ovlivňuje strukturní integritu buňky v jediné rostlině je požadovaným fenotypem.

Předkládaný vynález zahrnuje scénář inter-extragenní represe/komplementace/suprese, což znamená, že mutace v jedné podjednotce komplexu z více podjednotek může komplementovat mutaci v jiné podjednotce, aby se obnovila aktivita enzymu, regulačního proteinu nebo proteinu ovlivňujícího strukturní integritu buňky. V takovém scénáři mohou být polypeptidy/proteiny A a B shodné v obou rodičovských rostlinách, s výjimkou odlišných mutací. K příkladům patří regulační proteiny *E. coli*, jak je popsali Tokishita, S.I., Mizuno, T., 1994, Mol. Microbiol. (UK) 13/3, 435-444, a protein GroES a GroEL z *E. coli*, které popsali Zeilstra-Ryalls, J. et al., 1994, J. Bacteriol. (US), 176(21), 6558-65.

Dvojice rodičovských rostlin podle předkládaného vynálezu může být popsána jako dvojice komplementárních rostlin pro produkci hybridního osiva nebo dokonce jako dvojice komplementárních transgenních rostlin pro produkci transgenního hybridního osiva.

Nejpravděpodobnější je, že alespoň jedna z rodičovských rostlin je transgenní. Termín "transgenní" je zde užíván tak, že označuje nejen genetický materiál z jiného biologického druhu, ale také geneticky upravenou (manipulovanou) DNA z téže rostliny nebo téhož biologického druhu. Genetické manipulace rostlin lze provádět mikrobiologickým způsobem jako např. použitím *Agrobacterium tumefaciens* (Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffman, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G., Fraley, R.T., 1985, Science 227: 1229-1231). Alternativně manipulace zahrnují biolistickou transformaci, což je způsob odborníkovi dobře známý, použití *Agrobacterium rhizogenes*, ostřelování mikročásticemi, elektroporaci nebo použití polyetylénglykolu nebo křemičitých vláken.

Předkládaný vynález lze využít pro jakoukoliv rostlinu, zejména pro kukuřici, pšenici, rajče, řepku olejku, ječmen, slunečnici, len, hrách, fazol, meloun, papriku, dýni, okurku, lilek a jiné plodiny pěstované na velkých lánech.

Termín "jedna nebo několik genových sekvencí kódujících polypeptid..." znamená jakýkoliv počet úseků genetického materiálu (výhodně DNA), který může kódovat jeden nebo několik peptidů/ polypeptidů/proteinů. Takže "polypeptid" A nebo B ve skutečnosti obsahuje více než jednu aminokyselinovou sekvenci, které mohou být, ale nemusejí, spojeny nebo sdruženy. Místo jedné nebo několika genových sekvencí v rodičovském genomu není nijak omezeno. Pokud je přítomno více genových sekvencí než jedna, které kódují více než jeden peptid/ polypeptid/protein, vztah mezi jednotlivými kódujícími sekvencemi v každé rodičovské rostlině je relevantní pouze v té míře, že rodičovská rostlina neprojevuje požadovaný fenotyp (v žádné významné hladině). Když je jedna nebo několik genových sekvencí kódujících polypeptid A exprimováno v jedné a téže rostlině jako jedna nebo několik sekvencí kódujících polypeptid B, pak výsledkem podle předkládaného vynálezu je fenotyp enzymu, regulačního proteinu nebo proteinu ovlivňujícího strukturní integritu buňky. K proteinům, které ovlivňují strukturní integritu buňky,

patří proteiny destabilizující buněčnou membránu nebo vytvářející otvory nebo iontové kanály v buněčné membráně.

Konkrétním použitím předkládaného vynálezu je příprava rostlin se samčí sterilitou. Tudíž polypeptidy A a B, pokud se exprimují v téže rostlině, způsobují samčí sterilitu tím, že dojde k ablaci (vymizení) tapeta (vnitřní stěny prašného pouzdra). Alternativním použitím prvního aspektu předkládaného vynálezu je exprese polypeptidů A a B v téže rostlině, kde se vytváří aktivní enzym, regulační protein nebo protein, který ovlivňuje strukturní integritu buňky, což vede prostřednictvím ablace buněk ve specifickém pletivu k odlišnému fenotypu, jak bude ještě popsáno dále.

Kromě vzniku samčí sterility je možné v jiných aplikacích užít např. silnou hydrolázu jako je barnáza, je-li potřeba odstranění buněk, např. k odstranění nežádoucích orgánů v hybridním semenu. To může přispět výrazně ke snížení zpracovatelských nákladů. Příkladem je semeno bez embrya (bezzárodkové). Při výrobě mouky (z pšenice) nebo semoliny (z pšenice a kukuřice) nebo lupínků/vloček (z kukuřice) nebo i pro jiný účel, by bylo výhodné mít zrno bez zárodku. Použití promotorů specifických pro zárodek podle prvního aspektu předkládaného vynálezu umožní odstranit zárodek ze semena, a sice způsobem závislým na křížení. Tzn. taková semena budou vytvářena rostlinou obsahující jednu nebo několik genových sekvencí kódujících polypeptid A, která bude sprášena pylem z rostliny obsahující jednu nebo několik genových sekvencí kódujících polypeptid B. Je třeba zabránit samosprášení rostliny a, např. tak, že to bude rostlina se samčí sterilitou. Možné produkční schéma pro přípravu kukuřičného bezzárodkového zrna může být následující: Připraví se rostlina obsahující jednu nebo několik genových sekvencí kódujících polypeptid A (rostlina a) a rostlina obsahující jednu nebo několik genových sekvencí kódujících polypeptid B (rostlina b), které jsou předurčeny tak, že kombinace polypeptidu A a polypeptidu B v jednom semenu vede k odstranění embrya. Obrázek 5 ukazuje produkční schéma bezzárodkového zrna kukuřice podle předkládaného vynálezu.

Podle prvního aspektu předkládaného vynálezu je možně manipulovat také biochemické složení rostlin, např. enzymy biosyntézy mastných kyselin. Pokud má přítomnost neobvyklé, ale cenné mastné kyseliny škodlivý účinek pro rostlinu, bylo by užitečné produkovat semena s neobvyklým olejem (mastnou kyselinou) tak, že by se křížily dvě linie, které mají normální (nebo kvazinormální) složení oleje (do té míry, že žádná rodičovská linie není škodlivě ovlivněna) . Rozdělení enzymu odpovídajícího za biosyntézu cenné mastné kyseliny do dvou nebo více neaktivních částí, poskytuje praktický způsob, jak připravit semena obsahující cenný olej. Pokud je enzym odpovědný za požadovaný znak heteromultimerní, pak rozdělení genů pro jednotlivé monomery do dvou rodičovských rostlin je jednoduchým způsobem, jak implementovat vynález. Obecně je možně využít předkládaný vynález k získání hybridního osiva nebo hybridních rostlin, které mají zvláštní fenotyp, který nemá žádný z rodičů. Konkrétně je možné využít vynález k přípravě hybridních rostlin rezistentních k herbicidu, a sice pomocí křížení dvou rodičovských rostlin. Každá z rodičovských rostlin exprimuje jednu nebo několik nefunkčních částí aktivního enzymu, regulačního proteinu nebo proteinu ovlivňujícího strukturní integritu buňky, který je přímo či nepřímo zodpovědný za rezistenci k herbicidu. Jelikož jeden nebo několik genů v každé rodičovské rostlině zodpovědných za nový znak bude segregovat nezávisle, budou vznikat takové gamety hybridních rostlin (zejména pylová zrna), která povedou pouze k velmi nízkému přenosu znaku herbicidové rezistence na příbuzné rostliny nebo plevele (ve srovnání s klasickým jednogenovým znakem). Pokud je požadovaným produktem přímo hybridní semeno, požadovaný znak bude omezen na endosperm semena a embryo, neboť tato pletiva jsou genetickými hybridy.

Aktivní enzym, regulační protein nebo protein, který ovlivňuje strukturní integritu buňky, je výhodně lokalizován specificky (tj. je přítomen pouze ve vybraném pletivu). To vyžaduje, aby jedna nebo obě genové sekvence kódující polypeptid A a B byly operativně spojeny s vhodně stimulovaným promotorem, např. promotorem specifickým pro

dané pletivo, tak aby vznikl požadovaný fenotyp. Pokud pouze exprese jednoho polypeptidu je omezena na vybrané pletivo, druhý polypeptid vyžaduje konstitutivní expresi nebo alespoň takový expresní vzorec, který se překrývá s expresním vzorcem prvního polypeptidu.

Jak již bylo popsáno výše, exprese může být specifická pro semeno nebo embryo a promotory pro takový druh specifity jsou odborníkovi známy. V případě samčí sterility je promotor výhodně specifický pro tapetum. Ke známým promotorům tohoto typu patří promotor TA29 (EP-A-0344029), promotor A9 (Paul et al., Plant Molecular Bioogy 19: 611-622) a dále promotory popsané v dokumentu WO 95/29247. Aby měly heterozygotní rostliny požadovaný fenotyp, promotory musí být aktivní na úrovni sporofytu.

Výběr genu pro enzym, regulační protein nebo protein, který ovlivňuje strukturní integritu buňky, závisí samozřejmě na požadovaném fenotypu. Jakákoliv genová sekvence kódující enzym, regulační protein nebo protein, který ovlivňuje strukturní integritu buňky se může užít za předpokladu, že aktivita proteinu může být výsledkem asociace, interakce nebo kombinace dvou nebo více polypeptidů kódovaných dvěma nebo několika genovými sekvencemi, a že jejich aktivita povede k požadovanému fenotypu. Bezprostředně zřejmým proteinem pro takové použití je takový protein, který je přirozeně kódován ve formě dvou nebo více polypeptidů a který se sám sestaví/složí, čímž vytvoří konečnou proteinovou strukturu. Jednotlivé polypeptidové jednotky (podjednotky) by neměly mít žádnou významnou aktivitu *in vivo*.

K vhodným proteinům podle předkládaného vynálezu patří přirozeně heterodimerické proteiny jako jsou např. proteiny kukuřice C1-R a proteiny Apetala3-Pistillata (Ap3-Pi) z *Arabidopsis thaliana*. Když je přítomen v tapetu, dimerický protein Ap3-Pi může aktivovat geny odpovídající na tento transkripční faktor (které by normálně byly neaktivní, neboť tento transkripční faktor normálně v tapetu není nebo jen ve velmi nízké koncentraci). Aktivovaný gen je výhodně, ale nikoliv nutně, endogenní vzhledem k požadované rostlině. Např. exprese dimeru Ap3-Pi

v tapetu kukuřice aktivuje transkripci genů normálně se účastnících vývoje květu v jiných květních orgánech a zabrání normálnímu zrání pylu. Hladina sterility v takovém systému může být zlepšena ještě manipulací dceřinných rostlin, do kterých se vloží genová sekvence, která je ovlivněna vytvářeným aktivním enzymem nebo regulačním proteinem.

Jedním příkladem je vnesení genové sekvence barnázy nebo PR-glukanázy řízené promotorem Apetala 3 (pApetala3) do jedné z rodičovských linií. Promotor Apetala3 reaguje na dimer Ap3-Pi, a tudíž v dceřinných rostlinách dochází k expresi proteinu barnázy nebo PR-glukanázy. Takový systém poskytuje zlepšení samčí sterility s další výhodou, a sice že je řízen striktním kontrolním mechanismem (tj. pApetala 3). Takže příčina požadovaného fenotypu může být přímá, tj. přímý účinek enzymu, regulačního proteinu nebo proteinu ovlivňujícího strukturní integritu buňky, nebo může být nepřímá, tj. působící prostřednictvím intermediárního faktoru. Jiné transkripční faktory vhodné podle předkládaného vynálezu již existují v heterodimerní formě nebo je možné je na tuto formu upravit, a to např. pomocí dimerizační domény popsané dále ve vynálezu. Patří sem umělé transkripční faktory vytvořené asociací vazebné domény pro DNA a aktivační domény různého původu.

Alternativním využitím systému Apetala3-Pistillata je komplementace mutací v podjednotkách proteinů. Např. jedna z rodičovských rostlin může exprimovat oba proteiny, ale s mutací v jednom či druhém, takže v rostlině nevzniká aktivní dimer. Druhá rodičovská rostlina může exprimovat také oba proteiny, ale v tomto případě je mutace v druhém proteinu. Druhá rodičovská rostlina tedy také neexprimuje aktivní dimer. Křížení těchto rodičů pak vede k expresi genů, která vytváří aktivní dimer.

Ektopická exprese podjednotek pro tyto transkripční faktory se může užít k modulaci exprese jejich cílových genů a způsobovat samčí sterilitu nebo jiné znaky (včetně pleoitropních účinků) způsobem závislým na křížení.

Je také možné užít, podle prvního aspektu předkládaného vynálezu, proteiny, které musí být „uměle" rozděleny do dvou nebo více kódujících sekvencí nukleové kyseliny. Výsledné polypeptidy/proteiny se musí asociovat, sestavovat, interagovat nebo přijít do kontaktu jiným způsobem, když jsou exprimovány v jedné rostlině, aby vytvořily aktivní enzym, regulační protein nebo protein, který ovlivňuje strukturní integritu buňky. Takové umělé rozdělení enzymů a proteinů lze dnes snadno dosáhnout tím, že lze predikovat, kde může být protein rozdělen na dvě nebo více domén, a to např. predikcí pomocí strukturní biochemie jakou je např. rentgenová krystalografie, funkční analýza proteinů pomocí mutantů, predikce struktury na základě sekvence nebo omezená proteolýza a další techniky. Tímto způsobem lze identifikovat náhodnou šroubovici nebo jiné vhodné místo, kde může být protein rozdělen.

K příkladům uměle rozdělených proteinů patří:

Barnáza: tento protein byl široce užíván k tomu, aby způsoboval ablaci (odstranění) buněk, pokus byl exprimován ve specifickém pletivu. Je-li řízena promotorem specifickým pro tapetum, způsobuje exprese genu pro barnázu samčí sterilitu u mnoha druhů rostlin (EP-A-0344029). Je známo, že protein barnáza může být rozdělen do dvou polypeptidů, které samy o sobě nemají žádnou katalytickou aktivitu (in vitro). Pokud se oba polypeptidy dají dohromady, mohou se sami sestavit a vytvořit enzym, který má RNázovou aktivitu (Sancho a Fersht, 1992, J. Mol. Biol. 224: 741-747).

Může se užít také RNáza A. Bylo ukázáno, již dávno v r. 1959 (Richards a Vithayathil, J. Biol. Chem. 234: 1459-1465), že RNáza A může být podobně rozdělena mírným proteolytickým působením na dva polypeptidy, které mohou reasociovat a vytvořit aktivní enzym.

Aby bylo možné implementovat systém podle předkládaného vynálezu, obsahující umělé rozdělené proteiny, může být třeba navrhnout takové genetické konstrukty, ze kterých by bylo možné polypeptidy exprimovat. Pro vytvoření takových konstruktů, jejichž produkty budou asociovat a vytvoří aktivní enzym, mohou být potřebné některé modifikace.

Tak např. methioninový kodon se může přidat před ORF kódující druhou polovinu aktivního enzymu nebo stop-kodon se může přidat za ORF kódující první polovinu aktivního enzymu. Pokud jsou polypeptidy exprimovány jako C-koncová část translační fúze s jiným proteinem nebo s proteinovou zaměřovací sekvencí, pak start-kodon může chybět v ORF polypeptidu A a/nebo polypeptidu B, zatímco stop-kodon je stále potřeba k terminaci ORF polypeptidu A, případně polypeptidu B. Pokud je polypeptid A nebo polypeptid B exprimován jako N-koncová část translační fúze s jiným proteinem, pak ORF polypeptidu A nebo B bude začínat methioninovým kodonem, zatímco terminační kodon bude poskytnut ORF jiného proteinu, se kterým je fúzován. Příprava takových genetických konstruktů je odborníkovi známa.

Vynález může být proveden také tak, že se exprimují dvě části dvou různých enzymů, které společně poskytují odlišnou enzymovou aktivitu, než každý z intaktních rodičovských proteinů.

Výhodně jsou obě rodičovské rostliny homozygotní vzhledem ke genovým sekvencím kódujícím polypeptid A nebo polypeptid B. Takové genotypy zajišťují, že všechno potomstvo bude exprimovat aktivní enzym, regulační protein nebo protein, který ovlivňuje strukturní integritu buňky.

Jestliže je jeden nebo několik z polypeptidů (A nebo B) malý a jsou pochybnosti, zda je kterýkoliv z nich v buňce stabilní, je možné užít známý systém, kdy je malý polypeptid fúzován souhlasně ve čtecím rámci, s "nosičovým" proteinem, který ho ochraňuje před degradací nebo zvyšuje jeho proteolytickou stabilitu, ale přitom mu ponechává volnost interagovat s jinými polypeptidy, aby vytvořil aktivní enzym, regulační protein nebo protein, který ovlivňuje strukturní integritu buňky.

Nosičový protein může být vybrán tak, aby polypeptidy A nebo B nebyly ovlivněny fúzí. Vhodným nosičovým proteinem je např. β-glukuronidáza (GUS), protein, který toleruje adici ke svému NH_2 konci a navíc je dobrým reportérovým genem v rostlinách. V takovém případě se může využít hladina aktivity GUS k hodnocení úrovně exprese fúzovaného malého polypeptidu. To může být užitečné pro screening primárních

transformant. Jiným vhodným nosičovým proteinem je ubichitin (Hondred a Vierstra, 1992, Curr. Opin. Biotechnol. 3: 147-151, Vierstra, 1992, Plant Mol. Biol. 32: 275-302). Pokud je fúzován souhlasně ve čtecím rámci ke karboxylovému konci ubichitinu, akumuluje se protein výrazně v cytoplazmě. Navíc umělý fúzní protein s ubichitinem připomíná přirozený ubichitinový extenzní protein, např. UBQ1 z *Arabidopsis thaliana* (Callis et al., 1990, J. Biol. Chem. 265: 12486-12493) tím, že je štěpen přesně na C-konci ubichitinu (za Gly76) specifickou endogenní proteázou. Tímto procesem se uvolní připojený peptid nebo protein z fúzního proteinu, a to dovolí polypeptidům A a B sestavit se do funkčního enzymu nebo proteinu. Z důvodu ochrany malých proteinů před cytoplazmatickou proteolýzou, mohou se translační produkty zvětšit tím, že se fúzují s proteinovými zaměřovacími signály, např. na C-konci (Whelan a Glaser, 1997, Plant Mol. Biol. 33: 771-781) a mohou být nasměrovány do specifického místa v buňce jako je např. mitochondrie. Vhodným signálem je např. signál nalezený v AOX3 proteinu sóji (Finnegan a Day, Plant Physiol., 1997, 114, str. 155), což přidá 50 aminokyselin k polypeptidu A, případně polypeptidu B. Proteolytické zpracování spojené s transportem odstraní zaměřovací signál štěpením za Met50, a tím uvolní polypeptidy A a B do mitochondrie, kde se mohou asociovat/kombinovat a poškodit tak funkci mitochondrie a narušit životnost buňky.

V některých případech, pokud se exprimují dvě nebo více částí, polypeptidy nemusí spontánně asociovat, sestavit se, interagovat či jinak přijít do styku *in vivo*, aby vytvořily aktivní enzym, regulační protein nebo protein, který ovlivňuje strukturní integritu buňky. V jiných případech může být asociace polypeptidů slabá, takže je rekonstituováno jen málo aktivního enzymu. Aby se odstranily tyto problémy, každá část proteinu může být spojena s proteinovou dimerizační doménou, která umožní, aby se obě části dostali k sobě in vivo. Takové proteinové dimerizační domény proteinů se nacházejí v mnoha proteinech, které přirozeně vytvářejí dimery nebo multimery, a také způsoby spojení jsou odborníkovi známy.

Např. dvojitý motiv zinkového prstu lidského proteinu LIM bohatého na cystein byl fúzován s proteiny Gal4 a VP16. Na rozdíl od nemodifikovaných proteinů Gal4 a VP16, fúzované proteiny Lim-Gal4 a Lim-VP16 asociují *in vitro* a *in vivo* (v savčích buňkách NIH 3T3) a vytvářejí aktivní transkripční faktor (Feuerstein et al., 1994, PNAS USA 91: 10655-10659). Motiv LIM byl nalezen u mnoha organismů. Tak např. byl identifikován pylově specifický protein s doménou LIM slunečnice (Batlz et al., 1996, Plant Physiology, Supplemet III, 59). Existují i jiní proteinové dimerizační domény jako je např. leucinový zip (Turner R.. a Tijian, R., 1989, Science 243: 1689-1694), doména šroubovice-smyčka-šroubovice (Murre et al., 1989, Cell 56: 777-783), ankyrinová doména (Blank et al. 1993, Trend in Biochemical Sciences17: 135-140) a doména PAS (Huang et al, 1993, Nature 364: 259-2612).

Je také potřeba zajistit, aby geny kódující polypeptidy A nebo B byly vloženy do genomu rodičovských rostlin a a b ve stejném místě (nebo v těsně spojených místech), tak aby šance kosegregace v transgenním hybridu byla nízká. To může být výhodné např. v produkci hybridního osiva, neboť dva geny, které byly užity k vytvoření rodičovské rostliny se samčí sterilitou, následně segregují. Takže hybridní potomstvo generace F1 má 100% samčí fertilitu, neboť žádná hybridní rostlina nezdědí obě složky systému samčí sterility.

Genové sekvence nesené rodičovskými rostlinami a a b, které kódují části enzymu, regulačního proteinu nebo proteinu ovlivňujícího strukturní integritu buňky, mohou pocházet z různých organismů. Genové sekvence nemusejí být rostlinného původu a mohou obsahovat sekvence mikrobiálního nebo jiného původu. Genové sekvence mohou být např. endogenní sekvence *Arabidopsis thaliana* v rodičovských rostlinách kukuřice nebo rajčete. Genové sekvence mohou být také takové sekvence, které v kombinaci s promotorem specifickým pro určité pletivo jsou exprimovány v pletivu, kde tyto sekvence normálně exprimovány nejsou.

Druhý aspekt předkládaného vynálezu poskytuje způsob přípravy rostlin, které mají požadovaný fenotyp, tj. aktivní enzym, regulační protein

nebo protein, který ovlivňuje strukturní integritu buňky, kterýžto způsob obsahuje křížení první rostlinné linie s druhou rostlinnou linií, přičemž první linie obsahuje jednu nebo více genových sekvencí kódujících polypeptid A, který je částí enzymu, regulačního proteinu nebo proteinu ovlivňujícího strukturní integritu buňky ale přitom tato linie nemá takový fenotyp, a druhá linie obsahuje jednu nebo více genových sekvencí kódujících polypeptid B, který je komplementární k polypeptidu nebo proteinu A, ale přitom tato linie také nemá požadovaný fenotyp. Termín "komplementární" znamená, že pokud jsou exprimovány v jedné rostlině, polypeptidy A a B asociují, interagují nebo jinak přicházejí do styku, aby vytvořily fenotyp aktivního enzymu, regulačního proteinu nebo proteinu ovlivňujícího strukturní integritu buňky.

Součástí takového způsobu může být i jeden nebo několik znaků popsaných výše v prvním aspektu předkládaného vynálezu a vynález předpokládá využití těchto aspektů podle druhého aspektu předkládaného vynálezu.

Třetí aspekt vynálezu poskytuje semeno nebo rostlinu, které se získají z dvojice rodičovských rostlin podle prvního aspektu vynálezu nebo způsobem podle druhého aspektu předkládaného vynálezu.

Čtvrtý aspekt předkládaného vynálezu poskytuje semeno nebo rostlinu, které mají fenotyp enzymu, regulačního proteinu nebo proteinu ovlivňujícího strukturní integritu buňky, který je způsoben kombinovaným působením dvou nebo více transgenů, přičemž transgeny nejsou přítomny v téže kopii chromosomu. Výhodná provedení prvního, druhého a třetího aspektu předkládaného vynálezu platí také pro čtvrtý aspekt vynálezu. To znamená, že dva nebo několik transgenů jsou buďto na odlišných chromosomech nebo na různých kopiích téhož chromosomu, tj. rostlina je připravena křížením.

Předkládaný vynález bude dále podrobněji vysvětlen pomocí příkladů, které ho však nijak neomezují.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Rozdělení genu pro barnázu do dvou složek (viz obr. 1)

Výsledky, které publikovali Sancho a Ferscht (1992, J. Mol. Biol. 224: 741-747) ukázaly, že barnázovou aktivitu lze získat tak, že se kombinuje peptid A obsahující aminokyseliny 1 až 36 maturovaného proteinu barnázy s peptidem B obsahujícím aminokyseliny 37 až 110 maturované barnázy. Alela barnázy, kterou popsali Sancho a Fersch, je mutanta, která má methionin v poloze 36, což dovoluje štěpení kyanbromidem mezi pozicí 36 a 37 a vytvořit tak 2 peptidy. Pro expresi peptidů byly připraveny následující genové konstrukty:

Peptid A:

I. Gen barnázy s methioninovým kodonem (aminokyselinová pozice -1) přidaným před pozici 1 v sekvenci maturovaného proteinu barnázy, takže dochází k translaci, jak popsali Paul et al. (1992, Plant. Mol. Biol. 19: 611-622).

II. ORF kódující peptid nazvaný A*, obsahující methionin následovaný aminokyselinami 1 až 35 maturovaného proteinu barnázy a pak následovaný stop kodonem "ochre".

III. Gen vytvořený z ORF A* řízeného promotorem A9 pomocí IPCR na našem plazmidu p3079, který obsahuje gen AMS pA9-barnáza (stejně jako v I.)-barstar-CAMV 3´úsek (viz obr. 2).

Plazmid p3079 byl zkonstruován tak, že se klonoval fragment obsahující ORF pro barnázu-barstar, získaný pomocí PCR z pWP127 (Paul et al, 1992, viz výše), do našeho plazmidu p1415, který je derivátem pWP91 (WO-A-92113798), kde bylo restrikční místo EcoRV změněno na HindIII. IPCR pak byla provedena na p0379 pomocí primerů B3 a B4 (viz obr. 1 a 2) navržených tak, že sekvence mezi kodonem 36 barnázy a stop-

kodonem genu barstar není částí amplifikovaného produktu. Sekvence amplifikovaná pomocí IPOCR pak byla uzavřena (cirkularizována) ligací a výsledný plazmid byl zaveden do *E. coli*. Plazmid byl pak izolován, štěpen EcoRI a fragment obsahující ORF A* byl klonován do EcoRI míst p1415, takže ORF A* je řízen promotorem A9 ze sekvence nezasažené PCR. Výsledný plazmid p2022 obsahuje ORF A* v expresní kazetě A9.

IV. ORF kódující peptid nazvaný A**, obsahující počáteční methioninový kodon následovaný aminokyselinami 1 až 36 mutované barnázy (Sancho a Ferscht, 1992, viz výše), ale postrádající stop-kodon.

Tento konstrukt byl získán pomocí PCR na templátu p2022 s primery B5 (zachovávající místo XbaI na 5´-konci) a B6, který vytváří tupý 3´-konec.

V. Gen vytvořený translační fúzi ORF A** a ORF pro (Gly4 Ser)3/GUS, řízenou promotorem A9, produktem je peptid A fúzovaný v souhlasu se čtecím rámcem s N-koncem (Gly4 Ser)3/GUS (viz obr. 1D).

Konstrukt byl získán nahrazením ORF S-peptidu v plazmidu p2028 (viz příklad 3) ORF plazmidu A*. Aby se nahradil ORF, byla provedena PCR na plazmidu p2028 s primerem B7 (zachovává místo XbaI na 5´-konci) a B8 (vytváří tupý 3´-konec), která odstranila úsek kódující S peptid z translační fúze S-peptid-GUS. Po naštěpení XbaI byl fragment PCR kódující peptid A** (viz IV) vložen do místa XbaI/tupý konec akceptorové DNA připravené pomocí IPCR.

VI. ORF kódující peptid nazvaný A***, který je v podstatě shodný s peptidem A** (viz IV), až na to, že postrádá methioninový počáteční kodon a obsahuje stop-kodon "amber".

Konstrukt byl získán pomocí PCR na templátu p2022 pomocí primeru B9 (vytváří tupý 5´-konec) a B10 (vnáší místo BamHI na 3´-konec). 3´-konec PCR produktu byl pak naštěpen BamHI a byla zkonstruována translační fúze ubichitin-peptid A*** (viz dále).

VII. Gen připravený z translační fúze genomové DNA kódující ubichitin a ORF A*** řízené promotorem A9, jehož produktem je peptid A*** fúzovaný souhlasně se čtecím rámcem k C-konci ubichitinu (viz obr. 1E).

Genomová DNA kódující ubichitin byla získána pomocí PCR z chromosomové DNA *Arabidopsis thaliana*. Primery PCR Ubq16F a Ubq1R byly navrženy tak, aby amplifikovaly sekvenci kódující ubichitin z genu pro prodloužený protein ubichitin UBQ10,kterou publikovali Callis et al. (1990, viz výše). Restrikční místa XbaI (na 5´-konci) a BamHI (na 3´-konci), vnesené během PCR amplifikace, byla využita pro klonování PCR fragmentu pod kontrolu promotoru A9 do plazmidu p1415 naštěpeného XbaI a BamHI, čímž byl vytvořen plazmid p3245. Na p3245 pak byla provedena IPCR pomocí primerů UBQ1a a UBQ1b, čímž se vytvořil akceptorový tupý konec bezprostředně za ubichitinovým kodonem Gly76 a na 3´-konci se rekonstituovalo restrikční místo BamHI pro klonování. Po štěpení BamHI tento konstrukt sloužil jako akceptor pro PCR fragment kódující peptid A*** (viz VI).

Peptid B:

I. ORF peptidu B*, který začíná methioninovým kodonem následovaným kodony 37 až 110 maturované sekvence barnázy. Tím se přenesl methionin36 z mutovaného genu barnázy (Sancho a Ferscht, 1992, viz výše) z peptidu A na peptid B, čímž vznikly peptidy A*a B*.

II. Gen pro ORF B* obsahující ATG (aminokyselinová pozice -1) barnázy (v p3079) fúzovaný ke kodonu 37 barnázy, řízený promotorem A9, připravený odstraněním (pomocí IPCR s vhodnými primery) kodonů 1 až 36 sekvence maturované barnázy (viz dále).

Konstrukt byl připraven pomocí IPCR na p3079 s primery B1 a B2 (obr. 1 a 2) navrženými tak, že sekvence mezi kodony 2 a 36 barnázy není součástí amplifikovaného produktu (viz obr. 2). Produkt IPCR byl opracován stejně jak bylo popsáno pro ORF A* a klonován pod kontrolu promotoru A9 do p1415. Výsledný plazmid p2023 obsahoval ORFB*-barstar v expresní kazetě A9.

III. ORF kódující peptid B***, který se liší od B* (viz I) tím, že postrádá počáteční methionin.

IV. Gen připravený z translační fúze genomové DNA kódující ubichitin a ORF B*** řízené promotorem A9, jehož produktem je peptid B*** fúzovaný souhlasně se čtecím rámcem s C-koncem ubichitinu /viz ob. 1F).

IPCR byla provedena na plazmidu p2023 (viz výše) s primery B11 a B12, které zachovaly místo XbaI na 5´-konci B*, ale odstranily počáteční kodon ATG a ponechaly tupý 3´-konec. Po štěpení XbaI sloužil IPCR produkt jako akceptor pro DNA kódující ubichitin. Tato sekvence byla získána pomocí PCR na plazmidu p3245 (viz výše) s primery Ubq16F a Ubq1b zachovávajícími místo XbaI na 5´-konci a ponechávajícími tupý 3´-konec. Po štěpení XbaI byly produkty IPCR a PCR ligovány, čímž vytvořily uvedenou translační fúzi.

Na obrázku 1G: jsou uvedeny nukleotidové sekvence primerů, které byly použity pro PCR a IPCR, v příslušném pořadí.

Na obrázku 2: cirkulární plazmid p3079, obsahující A9 řízený gen barnáza/barstar (obrázek 1) v p1415, sloužil jako templát pro inverzní PCR. Protože primery PCR (obrázek 1) byly opačně orientovány, IPCR poskytovalo lineární dvojvláknovou plazmidovou DNA, ze které byl odstraněn úsek mezi 5' konci nasednutých PCR primerů (níže). Intramolekulární ligace pak poskytovala cirkulární deleční plazmidy, které byly vneseny do *E. coli* pro další subklonování.

Také na obrázku 2:

Řádek 1: Je ukázáno schematické znázornění (ne v měřítku) plazmidu p3079. Jsou zvýrazněny odlišné strukturální části kódujících úseků. ATG a TAA představují start a stop-kodon barnázy a barstar. Jsou vyznačeny relativní pozice kodonů 35, 36 a 37 maturovaného proteinu Barnázy.

Řádek 2: kodony 1 až 36 maturovaného proteinu Barnázy. Intramolekulární ligace lineárního delečního plazmidu pak fúzovala start-kodon ATG ke kodonu 37 za vzniku úseku pepB*/barstar.

Řádek 3: IPCR s primery B3 a B4 odstranila sekvenci po směru čtení z barnázy kodon 35, jak je vyznačeno. Intramolekulární ligace lineárního delečního plazmidu pak fúzovala kodon 35 barnázy ke stop-kodonu barstar za vzniku sekvence pepA*.

Příklad 2

Transformace rostlin genovými konstrukty z příkladu 1

Geny pA9-A* a pA9-B* exprimující polypeptid A a polypeptid B z promotoru A9 (WO92/11379) byly klonovány do derivátů rostlinného transformačního vektoru pBin19 (Beven et al., 1984, Nucl. Ac. Res., 12, 8711, Frish et al., 1995, Plant Mol. Biol., 27, 405-409) a byly získány rostliny Arabidopsis obsahující pA9-polypeptid A nebo pA9-polypeptid B nebo oba geny. Rostliny obsahující oba geny byly se samčí sterilitou, zatímco rostliny obsahující jeden gen byly transgenem neovlivněny.

Rostlinám s jedním genem bylo umožněno samosprášení, jejich potomstvo bylo sklizeno a bylo analyzováno, aby se identifikovaly homozygotní a heterozygotní rostliny T1. Rostliny T1 s pA9-polypeptidem A byly zkříženy s rostlinami T1 s pA9-polypeptidem B. Získaná hybridní semena projevovala predikovaný fenotyp: divokého typu, obsahovala-li pouze jeden gen, a samčí sterilitu, když obsahovala dva geny.

Geny byly vneseny do kukuřice a rajčete biolistickou transformací nebo transformací zprostředkovanou *Agrobacterium*, a rostliny byly stejným způsobem regenerovány a vyhodnotila se u nich samčí sterilita (Mornish et al., 1990, Biol/Technology, 8, 833-839 a Fillati et al., 1987 Bio/Technology, 5, 726-7390).

Příklad 3

Rozdělení genu RNázy A do dvou složek (obrázky 3 a 4)

Z práce Richardse a Vithayathila (1959 výše) víme, že enzym RNáza A může být štěpen (proteázou subtilizinem) za vzniku dvou polypeptidů: S-peptid obsahuje aminokyseliny 1 až 20 z RNázy A a S-protein obsahuje aminokyseliny 21 až 124 z RNázy A. Když jsou S-peptid a S-protein smíšeny, asociují a rekonstituují aktivní enzym. Posledních 5 aminokyselin z S-peptidu není pro rekonstituci RNázy A zapotřebí, menší S-peptid vytvořený z aminokyselin 1 až 15 je dostačující. K vývoji systému podle vynálezu byly použity geny, které exprimují S-peptid a S-protein řízené promotorem A9.

Počáteční materiál byl syntetický gen kódující bovinní pankreatickou RNázu A (Vasantha a Filpula, 1989, Gene, 76, 53-60). Gen kódující ORF z RNázy A byl vytvořen za použití syntetických oligonukleotidů (viz obrázky 3A a 3B). Nukleotidová sekvence genu byla navržena tak, aby byla kompatibilní s použitím kodonu kukuřice, podle autorů Fennoy a Bailey-Serres, 1993, Nuc. Acids Res., 21, 5294-5300. Pro amplifikaci z kompletní

ORF byla použita PCR s vhodnými primery. Byly vytvořeny následující ORF:

S-peptid:

I) ORF pro S-peptid obsahující methioninový translační iniciační kodon následovaný kodony 1 až 15 maturované sekvence RNázy A (viz obrázky 4A a 4B) a ukončený stop-kodonem "ochre".

II) ORF vytvořený z methioninového translačního iniciačního kodonu následovaného kodony 1 až 15 maturované sekvence RNázy A, následováno sekvencí linkeru kódující (Gly4-Ser)3 (viz obrázky 4A a 4B). Tento gen byl navržen tak, že může být fúzován v rámci k ORF z proteinu GUS klonováním v místě BamHI plazmidu p2027, který obsahuje gen GUS z pBI101.3 (Jefferson, 1987, Plant Mol. Biol. Reporter, 5, 387-405).

III) Translační fúze obsahující ORF zaměřovací sekvence z proteinu AOX3 pro mitochondrii (viz výše) a ORF z fúze S-peptid-GUS, jak popsáno v II), ale postrádající methioninový translační iniciační kodon (obrázek 4C). Genový produkt uvedené translační fúze ukazuje, že S-peptid-GUS protein fúzoval k C-koncové části zaměřovací sekvence.

S-protein:

I) ORF pro „S-protein +5“, který obsahuje methioninový translační iniciační kodon následovaný kodony 16 až 124 maturované sekvence RNázy A a je ukončen kodonem ochre.

II) ORF pro S-protein, který obsahuje methioninový translační iniciační kodon následovaný kodony 21 až 124 maturované sekvence RNázy A a je ukončen kodonem "ochre".

III) Translační fúze obsahující ORF zaměřovací sekvence z proteinu AOX3 pro mitochondrii (viz výše) a ORF z S-proteinu, jak je popsáno v II), ale postrádající methioninový translační iniciační kodon

(obrázek 4C). Genový produkt uvedené translační fúze ukazuje S-protein fúzovaný k C-koncové části ubichitinu.

IV) Translační fúze obsahující genomovou DNA kódující ubichitin a ORF z S-proteinu, jak popsáno v II), ale postrádající methioninový translační iniciační kodon (obrázek 4C). Genový produkt uvedené translační fúze ukazuje S-protein fúzovaný k C-koncové části ubichitinu.

Poté byly vytvořeny geny pod kontrolou promotoru A9 a vneseny do rostlin jako v příkladě 2.

Na obr. 3A: byly konstruovány sekvence kódující S-peptid, S(+5)-protein a S-protein, nejdříve nasednutím "sense" oligonukleotidů RN-I až RN-VII (dráhy 2, 5, 7, 9, 11, 13, 16) spolu s komplementárními vodícími oligonukleotidy RN-1 až RN-6 (dráhy 3, 6, 8, 10, 12, 14), a poté selektivní ligací správně orientovaných "sense" oligonukleotidů za použití ligázy Taq-DNA.

Ligace vedla k vytvoření spojitého jednoduchého vlákna DNA (sense), které pak bylo amplifikováno DNA polymerázou Vent (25 cyklů PCR) za použití jednoho ze dvou párů primerů, následujícím postupem: I) primery RN-a (Řádek 1) a RN-b (Řádek 15) amplifikovaly celý ligační produkt. Produkt PCR byl purifikován v gelu a štěpen restrikčními enzymy BamHI (podtrženo, dráhy 1 a 15) a BglII (podtrženo, dráhy 2 a 4) za vzniku dvou fragmentů DNA kódujících S-peptid a S(+5) protein. Tyto dva fragmenty byly odděleně klonovány do místa BamHI po směru od promotoru pA9 do plazmidu p1415 za vzniku plazmidů p4837 (S-peptid) a p4838 (S+5 protein). II) primery RN-d (Řádek 4) a RN-b (Řádek 15) amplifikovaly kódující sekvenci S-proteinu. Produkt PCR byl klonován, jak popsáno v I) za vzniku plazmidu p4839 (S-protein).

Řádek 1: primer PCR (sense) RN-a

Řádek 2: oligonukleotid RN—I a srovnání s oligonukleotidem RN-II

Řádek 3: vodící oligonukleotid RN-1 (antisense)

Řádek 4: primer PCR (sense) RN-d

Řádek 5: oligonukleotid RN—II (pokračování z dráhy 2) a srovnání s oligonukleotidem RN-IIIN

Řádek 6: vodící oligonukleotid RN-2N (antisense)

Řádek 7: oligonukleotid RN—IIIN (pokračování z dráhy 5) a srovnání s oligonukleotidem RN-IV

Řádek 8: vodící oligonukleotid RN-3 (antisense)

Řádek 9: oligonukleotid RN—IV (pokračování z dráhy 7) a srovnání s oligonukleotidem RN-V

Řádek 10: vodící oligonukleotid RN-4 (antisense)

Řádek 11: oligonukleotid RN—V (pokračování z dráhy 9) a srovnání s oligonukleotidem RN-VI

Řádek 12: vodící oligonukleotid RN-5 (antisense)

Řádek 13: oligonukleotid RN—VI (pokračování z dráhy 11) a srovnání s oligonukleotidem RN-VII

Řádek 14: vodící oligonukleotid RN-6 (antisense)

Řádek 15: primer PCR (antisense) RN-b

Řádek 16: oligonukleotid RN—VII (pokračování z dráhy 13)

Symboly: (5'): nefosforylovaný 5' konec

(5P): fosforylovaný 5' konec

(3OH): konvenční 3' konec

(malá písmena): báze přidané pro pohodlné klonování.

Na obr. 3B: sekvence kódující S-peptid s (Gly4Ser)3-spojovacím peptidem byly konstruovány nejdříve nasednutím sense oligonukleotidů RN-I a RN-VIII (dráhy 2 a 4) podle komplementárního vodícího oligonukleotidu RN-7, a poté selektivní ligací správně orientovaných oligonukleotidů za použití ligázy Taq-DNA.

Ligace vedla k vytvoření jednoduchého vlákna DNA, které pak bylo amplifikováno DNA polymerázou Vent (25 cyklů PCR) za použití páru

primerů RN-a (Řádek 1) a RN-c (Řádek 5). Tato reakce PCR poskytla kompletní dvojvláknový ligační produkt. Produkt PCR byl purifikován v gelu, pak štěpen restrikčními enzymy BamHI (podtrženo, Řádek 1) a BglII (podtrženo, Řádek 5) a klonován do místa BamHI z p2027 za vzniku fúze NH_2-koncového proteinu s GUS pod kontrolou promotoru pA9 (p2027 byl konstruován klonováním kódující sekvence GUS z pBI101.3 jako fragmentu BamHI/ SmaI do místa BamHI z p1415). Tak vznikl plazmid p2028.

Řádek 1: primer PCR (sense) RN-a
Řádek 2: oligonukleotid RN—I kódující S-peptid jako na obrázku 3A a srovnání s oligonukleotidem RN-VIII kódujícím (Gly4Ser)3-spojovací peptid
Řádek 3: vodící oligonukleotid (antisense) RN-7
Řádek 4: oligonukleotid RN—VIII (pokračování z dráhy 2)
Řádek 5: primer PCR (antisense) RN-c

Symboly: (5'): nefosforylovaný 5' konec
(5P): fosforylovaný 5' konec
(3OH): konvenční 3' konec
(malá písmena): báze přidané pro pohodlné klonování.

Na obrázku 4A: jsou ukázány proteinová a DNA sekvence pro S-peptid a S-peptid se spojkou (Gly4Ser)3. Spojovací sekvence S-peptidu byla v rámci fúzována s GUS za vzniku plazmidu p2028, jak je popsáno pro obrázek 3B.

Na obrázku 4B: je ukázán ORF pro (S+5)-protein a S-protein, jak je obsažen v plazmidech p4838 a p4839. Tyto plazmidy byly popsány výše pro obrázek 3A.

Na obrázku 4C:

I) PCR s primery AOX3MI1 a AOX3MI2 byla získána zaměřovací sekvence pro mitochondriální protein (zkratky posledních čtyř aminokyselin: Leu-Arg-Arg-Met) z plazmidu, který obsahoval cDNA alternativní oxidázy (AOX3) sojového bobu, jak publikovali Finnegan a Day, 1997, (Plant Physiol., 114, 455). Během tepelných cyklů byla vnesena restrikční místa (XbaI a BglII na 5' konec a AflII a BamHI na 3' konec) za vzniku produktu PCR, který byl klonován do místa XbaI/BamHI po směru od promotoru A9 v p1415. Tento plazmid byl nazván p0200.

II) Pak byly použity primery SPEPMI1 a SPEPMI2 ke tvorbě fragmentu PCR z plazmidu p4837, který kóduje po směru transkripce od restrikčního místa AflII chybějící čtyři aminokyseliny (Leu-Arg-Arg-Met) mitochondriálního zaměřovacího signálu následovaného ORF z S-peptidu. PCR vytvořené místo BamHI na 3' konci umožnilo klonování fragmentu PCR jako fragmentu AflII/BamHI do p0200. Toto klonování poskytlo plazmid p0203, obsahující kompletní ORF translační fúze, jak ukázáno.

III) Translační fúze mitochondriální zaměřovací sekvence a ORF z S-peptid-GUS vznikala podobným způsobem, jak je popsáno v II), kromě toho, že PCR primery SPEPMI1 a SPEPMI2 byly použity na templátu p2028 za vzniku fragmentu AflII/BamHI, který byl klonován do p0200 za vzniku p0204.

IV) Translační fúze mitochondriální zaměřovací sekvence a ORF z S-proteinu vznikala podobným způsobem, jak je popsáno v II) a III), kromě toho, že PCR primery SPROTMI1 a SPROTMI2 byly použity na templátu p4838 za vzniku fragmentu AflII/BamHI, který byl klonován do p0200 za vzniku p0202.

V) Z templátu p4839 s primery SPROTF a SPROTR vznikal fragment PCR obsahující ORF z S-proteinu mezi restrikčními místy BamHI na každém konci. Po štěpení s BamHI byl tento fragment PCR klonován

do místa BamHI z p3245, což dalo vznik translační fúzi v p3249 genomové ubichitinové DNA a S-proteinu, jak je ukázáno.

Příklad 4

Použití dimerního proteinu Apetala3-Pistillata

Apetala3 (Ape3) a Pistillata (Pi) jsou dva proteiny z *Arabidopsis thaliana*, které jsou zapojeny do regulace diferenciace květu.. Geny jsou známy, zatímco endogenní vzorec exprese v tapetu znám není. Exprese genů v tapetu kukuřice vede k poruše normálního vývoje prašníků tím, že aktivuje normálně umlčené geny. Tyto geny mohou být také použity k aktivaci promotoru *Arabidopsis* responzivního na dimer Ap3-Pi v tapetu kukuřice, jako je promotor Ap3 (pAp3) sám.

Vytvořili jsme následující geny:

pA9-Apetala3

cDNA pro Ap3 (Jack et al., 1992, Cell, 68, 683-697, GenBank Accession No. M86357) byla klonována do A9 expresní kazety z pWP91 (WO-A-9211379) za vzniku plazmidu p4796. Tento plazmid obsahuje Ap3 cDNA s přibližně 15 bázemi z 5' netranslatované sekvence, následováno celým ORF (698 bazí z ATG do TAA), následováno přibližně 120 bázemi z 3' netranslatované sekvence, klonované do místa BamHI z pWP91.

pA9-Pistillata

cDNA pro Pi (Goto a Meyerowitz, 1994, Genes Dev., 8, 1548-1560, GenBank Accession No. D30807) byla klonována do A9 expresní kazety z pWP91 (WO-A-9211379) za vzniku plazmidu p0180. Tento plazmid obsahuje Pi cDNA s přibližně 24 bázemi z 5' netranslatované sekvence, následováno celým ORF (626 bazí z ATG do TGA), následováno přibližně 250 bázemi z 3' netranslatované sekvence, klonované do míst XbaI-BamHI z pWP91.

pApetala3-PRGlukanáza

A9 promotorová sekvence z plazmidu A9PR (popsáno ve Worrall et al., 1992, The Plant Cell, 4, 759-771) byla nahrazena sekvencí o velikosti 1250 bp (přibližně) obsahující úsek promotoru Ap3, získaný amplifikací PCR z genomové DNA *Arabidopsis thaliana*, podle publikované sekvence (Jack et al., 1994, Cell, 76, 703-716), za vzniku plazmidu p4817.

Geny byly vneseny do kukuřice v různých kombinacích biolistickou transformační technikou, v oboru známou. Rostliny byly regenerovány a vyšetřeny na samčí fertilitu.

- p4796 (pA9-Ap3)/p0180 (pA9-Pi) způsobují samčí sterilitu. Žádný z nich samotný nezpůsobuje samčí sterilitu.
- p4796/p0180/p4817 (pAp3- PRGlukanáza) způsobují sterilitu, zatímco p4817 s pouze jedním nebo dvěma geny transkripčních faktorů nezpůsobuje.

23.09.99

PV 1976-99
65909

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Dvojice rodičovských rostlin pro produkci semen, která obsahuje

I) první rodičovskou rostlinu, která obsahuje jednu nebo několik genových sekvencí kódujících polypeptid nebo protein A, a

II) druhou rodičovskou rostlinu, která obsahuje jednu nebo několik genových sekvencí kódujících polypeptid nebo protein B,

přičemž polypeptidy A, B, pokud jsou exprimovány v různých rostlinách, nevytvářejí aktivní enzym, regulační protein ani protein, který ovlivňuje funkčnost a/nebo životaschopnost a/nebo strukturní integritu buňky, ale pokud jsou exprimovány v téže rostlině, vytvářejí aktivní enzym, regulační protein nebo protein který ovlivňuje strukturní integritu buňky.

2. Dvojice rostlin podle nároku 1, kde jedna nebo několik genových sekvencí alespoň jednoho rodičů je transgenní.

3. Dvojice rostlin podle nároku 1 nebo 2, kde polypeptidy nebo proteiny A, B, pokud jsou exprimovány v téže rostlině, způsobují ablaci buněk, která vede zvláště k samčí sterilitě nebo semenům bez zárodků.

4. Dvojice rostlin podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, kde jedna z rodičovských rostlin projevuje samčí sterilitu.

5. Dvojice rostlin podle kteréhokoliv z nároků 2 až 4, kde jedna nebo více genových sekvencí, kódujících buďto oba nebo jeden z polypeptidů nebo proteinů A, B, jsou operativně spojeny s promotorem specifickým pro určité pletivo.

6. Dvojice rostlin podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, kde polypeptidy A,B jsou přirozeně se vyskytující podjednotky proteinového komplexu aktivního

enzymu, regulačního proteinu nebo proteinu, který ovlivňuje strukturní integritu buňky.

7. Dvojice rostlin podle nároku 6, kde polypeptidy A, B jsou dvě polypeptidové podjednotky enzymu, který má Rnázovou aktivitu, jako je např. enzym barnáza nebo Rnáza A, nebo jsou to monomery proteinového komplexu „Apelata3-Pistillata".

8. Dvojice rostlin podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, kde polypeptidy A, B jsou uměle rozdělené polypeptidy aktivního enzymu, regulačního proteinu nebo proteinu, který ovlivňuje strukturní integritu buňky.

9. Dvojice rostlin podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, kde každá rodičovská rostlina je homozygotní vzhledem k jedné nebo více genovým sekvencím kódujícím polypeptid A, popřípadě B.

10. Dvojice rostlin podle kteréhokoliv z nároků 3 až 9, kde příčina samčí sterility je přímá nebo nepřímá.

11. Dvojice rostlin podle kteréhokoliv z nároků 5 až 10, kde promotor specifický pro určité pletivo je promotor specifický pro tapetum, promotor specifický pro zárodek nebo promotor specifický pro semeno.

12. Dvojice rostlin podle kteréhokoliv z nároků 1 až 11, kde jeden nebo oba polypeptidy nebo proteiny jsou fúzovány s nosičovým proteinem a/nebo signálním zaměřovacím proteinem.

13. Dvojice rostlin podle kteréhokoliv z nároků 1 až 12, kde každý z polypeptidů nebo proteinů A, B je spojen s dimerizační doménou proteinu ze sekvence dimerního nebo multimerního proteinu, která podporuje asociaci podjednotek A a B.

14. Dvojice rostlin podle kteréhokoliv z předchozích nároků, kde jedna nebo několik genových sekvencí alespoň jedné z rodičovských rostlin je heterologní genová sekvence.

15. Způsob přípravy rostlin, které mají požadovaný fenotyp díky působení aktivního enzymu, regulačního proteinu nebo proteinu, který ovlivňuje strukturní integritu buňky, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje křížení první linie s druhou linií, kdy první linie obsahuje jednu nebo několik genových sekvencí kódujících polypeptid nebo protein A, ale přitom nemá požadovaný fenotyp, a kdy druhá linie obsahuje jednu nebo několik genových sekvencí kódujících polypeptid nebo protein B, který je komplementární k polypeptidu nebo proteinu A, ale přitom tato linie nemá požadovaný fenotyp.

16. Způsob podle nároku 15 v y z n a č u j í c í s e t í m, že jedna nebo více genových sekvencí alespoň z jedné linie je transgenní.

17. Způsob podle nároku 15 nebo 16 v y z n a č u j í c í s e t í m, že požadovaný fenotyp je ablace buněk, zejména samčí sterilita nebo semeno bez zárodku.

18. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 15 až 17 v y z n a č u j í c í s e t í m, že jedna z linií projevuje samčí sterilitu.

19. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 15 až 18 v y z n a č u j í c í s e t í m, že jedna nebo více genových sekvencí kódujících polypeptidy nebo proteiny A a/nebo B jsou operativně spojeny s promotorem specifickým pro určité pletivo.

20. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 15 až 19 v y z n a č u j í c í s e t í m, že polypeptidy nebo proteiny A, B jsou přirozeně se vyskytující podjednotky proteinového komplexu aktivního

enzymu, regulačního proteinu nebo proteinu, který ovlivňuje strukturní integritu buňky.

21. Způsob podle nároku 20 v y z n a č u j í c í s e t í m, že polypeptidy nebo proteiny A, B jsou dvě polypeptidové podjednotky enzymu, který má Rnázovou aktivitu, jako je např. enzym barnáza nebo Rnáza A, nebo jsou to monomery proteinového komplexu „Apelata3-Pistillata".

22. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 15 až 19 v y z n a č u j í c í s e t í m, že polypeptidy nebo proteiny A, B jsou uměle rozdělené polypeptidy aktivního enzymu, regulačního proteinu nebo proteinu, který ovlivňuje strukturní integritu buňky.

23. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 15 až 22 v y z n a č u j í c í s e t í m, že každá linie je homozygotní vzhledem ke genové sekvenci kódující polypeptid nebo protein A, popřípadě B.

24. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 15 až 23 v y z n a č u j í c í s e t í m, že požadovaným fenotypovým znakem je přímá nebo nepřímá samčí sterilita.

25. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 15 až 24 v y z n a č u j í c í s e t í m, že promotor specifický pro určité pletivo je promotor specifický pro tapetum, promotor specifický pro zárodek nebo promotor specifický pro semeno.

26. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 15 až 25 v y z n a č u j í c í s e t í m, že jeden nebo oba polypeptidy nebo proteiny A, B jsou fúzovány s nosičovým proteinem a/nebo signálním zaměřovacím proteinem.

27. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 15 až 26 vyznačující se tím, že každý z polypeptidů nebo proteinů A, B je spojen s odlišnou dimerizační doménou proteinu z dimerního nebo multimerního proteinu.

28. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 15 až 27 vyznačující se tím, že alespoň jedna z linií obsahuje jednu nebo několik heterologních genových sekvencí.

29. Semeno nebo rostlina, které lze získat z dvojice rostlin podle kteréhokoliv z nároků 1 až 14 nebo způsobem podle kteréhokoliv z nároků 15 až 28.

30. Semeno nebo rostlina, která má fenotyp aktivního enzymu, regulačního proteinu nebo proteinu, který ovlivňuje strukturní integritu buňky, kterýžto fenotyp je způsoben kombinovaným působením dvou nebo více transgenů, které nejsou přítomny v téže kopii chromosomu.

23.09.99
PV 2946-99
65309

Obr. 1A

Kódující sekvence barnázy

```
1                   met ala gln val ile asn thr phe asp gly val ala asp tyr leu gln thr tyr
2          TCTAGACC ATG GCA CAG GTT ATC AAC ACG TTT GAC GGG GTT GCG GAT TAT CTT CAG ACA TAT
3   3'gttcatgagatctgg tac 5' (B1 primer)

1                   his lys leu pro asp asn tyr ile thr lys ser glu ala gln ala leu gly trp
2                   CAT AAG CTA CCT GAT AAT TAC ATT ACA AAA TCA GAA GCA CAA GCC CTC GGC TGG
3                                                   (B4 primer)  3'  t gtt cgg gag ccg acc5'

1                   val ala ser lys gly asn leu ala asp val ala pro gly lys ser ile gly gly
2                   GTG GCA TCA AAA GGG AAC CTT GCA GAC GTC GCT CCG GGG AAA AGC ATC GGC GGA
3                     5'gca tca aaa ggg aac c 3' (B2 primer)

1                   asp ile phe ser asn arg glu gly lys leu pro gly lys ser gly arg thr trp
2                   GAC ATC TTC TCA AAC AGG GAA GGC AAA CTC CCG GGC AAA AGC GGA CGA ACA TGG
3

1                   arg glu ala asp ile asn tyr thr ser gly phe arg asn ser asp arg ile leu
2                   CGT GAA GCG GAT ATT AAC TAT ACA TCA GGC TTC AGA AAT TCA GAC CGG ATT CTT
3

1                   tyr ser ser asp trp leu ile tyr lys thr thr asp his tyr gln thr phe thr
2                   TAC TCA AGC GAC TGG CTG ATT TAC AAA ACA ACG GAC CAT TAT CAG ACC TTT ACA
3

1                   lys ile arg OCH
2                   AAA ATC AGA taa
3
```

Obr. 1B

Mezigenová sekvence

```
CGAAAAAAACGGCTTCCTGCGGAGGCCGTTTTTTTCAGCTTTACATAAAGTGTGTAATAAATTTTTCTTCAAACTCTGATCGGTCAATTT
CACTTTCCGGATCCGGTCCAATCTGCAGCCGTCCGAGACAGGAGGACATCGTCCAGCTGAAACCGGGGCAGAATCCGGCCATTTCTGAAG
AGAAAAATGGTAAACTGATAGAATAAAATCATAAGAAAGGAGCCGCAC
```

Obr. 1C

Kódující sekvence barstar

```
1                Met lys lys ala val ile asn gly glu gln ile arg ser ile ser asp leu his
2                ATG AAA AAA GCA GTC ATT AAC GGG GAA CAA ATC AGA AGT ATC AGC GAC CTC CAC
3

1                gln thr leu lys lys glu leu ala leu pro glu tyr tyr gly glu asn leu asp
2                CAG ACA TTG AAA AAG GAG CTT GCC CTT CCG GAA TAC TAC GGT GAA AAC CTG GAC
3

1                ala leu trp asp cys leu thr gly trp val glu tyr pro leu val leu glu trp
2                GCT TTA TGG GAT TGT CTG ACC GGA TGG GTG GAG TAC CCG CTC GTT TTG GAA_TGG
3

1                arg gln phe glu gln ser lys gln leu thr glu asn gly ala glu ser val leu
2                AGG CAG TTT GAA CAA AGC AAG CAG CTG ACT GAA AAT GGC GCC GAG AGT GTG CTT
3

1                gln val phe arg glu ala lys ala glu gly cys asp ile thr ile ile leu ser
2                CAG GTT TTC CGT GAA GCG AAA GCG GAA GGC TGC GAC ATC ACC ATC ATA CTT TCT
3

1                OCH
2                TAA TACGATCAATGGGAGATGAACAATATAGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTC
3              5'taa tacgatcaatgggagatg 3' (B3 primer)
```

1: Translatovaná sekvence DNA kódující barnázu (A) a barstar (C)
2: DNA kódující barnázu (A), barstar (C) a syntetický mezigenový úsek (B) podle publikace Paul et al. (1992)
3: Sekvence primerů, které byly užity v IPCR ke konstrukci pepA* (B3/B4) a pepB* (B1/B2).

Obr. 1D

Translační fúze ORF peptidA**/(Gly4ser)3 spojovací peptid/GUS

```
          met ala gln val ile asn thr phe asp gly val ala asp tyr leu gln thr tyr his lys
tctagacc ATG GCA CAG GTT ATC AAC ACG TTT GAC GGG GTT GCG GAT TAT CTT CAG ACA TAT CAT AAG

          leu pro asp asn tyr ile thr lys ser glu ala gln ala leu gly trp met gly gly gly
          CTA CCT GAT AAT TAC ATT ACA AAA TCA GAA GCA CAA GCC CTC GGC TGG ATG GGC GGT GGC

          gly ser gly gly gly gly ser gly gly gly gly ser gly ile pro gly tyr gly gln ser
          GGT TCC GGT GGC GGT GGC AGC GGC GGC GGT GGT AGC GGg atc ccc ggg tac ggt cag tcc

          pro met
          ctt atg ... of GUS
```

Podtrženo: ORF peptidu A**

Obr. 1E

Nukleotidová sekvence translační fúze genomové sekvence ubichitinu a ORF peptidu A***

```
  tctagacc ATGCAGATCT TCGTGAAAAC CTTGACCGGC AAGACCATCA CTCTCGAGGT CGAGAGCAGC GACACCATCG
ACAATGTCAA GGCCAAGATC CAAGACAAAG AAGGTATCAT TCTTCCTCAC TCAATCTGGA TTCTTCTCTT TAGCTTTTTG
AAATTCAGAT CTCTTATCAT TTACTTGTTT CTCCTTTAAG GAATCCCTCC GGATCAGCAG AGATTGATCT TCGCCGGAAA
GCAGCTCGAA GATGGCCGTA CTTTGGCTGA CTACAACATC CAGAAAGGTA CGAAATCATC CGAATCCTTC TGTTGATCAT
TTCGATGATC TGATTGTATA AACTCTAATG GATTGTTATC ATTTGTAAAC AGAATCTACA CTTCATCTTG TGTTGAGGCT
TAGACGTGGA GCACAGGTTA TCAACACGTT TGACGGGGTT GCCGATTATC TTCAGACATA TCATAAGCTA CCTGATAATT
ACATTACAAA ATCAGAAGCA CAAGCCCTCG GCTGGATGTA Gaggatcc
```

Podtrženo: Introny A a B v ubichitinové sekvenci
Tučně: Kodon pro glycin76 na konci ORF ubichitinu

Obr. 1F

Nukleotidová sekvence translační fúze genomové sekvence ubichitinu a ORF peptidu B***

```
  tctagacc ATGCAGATCT TCGTGAAAAC CTTGACCGGC AAGACCATCA CTCTCGAGGT CGAGAGCAGC GACACCATCG
ACAATGTCAA GGCCAAGATC CAAGACAAAG AAGGTATCAT TCTTCCTCAC TCAATCTGGA TTCTTCTCTT TAGCTTTTTG
AAATTCAGAT CTCTTATCAT TTACTTGTTT CTCCTTTAAG GAATCCCTCC GGATCAGCAG AGATTGATCT TCGCCCGAAA
GCAGCTCGAA GATGGCCGTA CTTTGGCTGA CTACAACATC CAGAAAGGTA CGAAATCATC CGAATCCTTC TGTTGATCAT
TTCGATGATC TGATTGTATA AACTCTAATG GATTGTTATC ATTTGTAAAC AGAATCTACA CTTCATCTTG TGTTGAGGCT
TAGAGGTGGA GCATCAAAAG GGAACCTTGC AGACGTCGCT CCGGGGAAAA GCATCGGCGG AGACATCTTC TCAAACAGGG
AAGGCAAACT CCCGGGCAAA AGCGGACGAA CATGGCGTGA AGCGGATATT AACTATACAT CAGGCTTCAG AAATTCAGAC
CGGATTCTTT ACTCAAGCGA CTGGCTGATT TACAAAACAA CGGACCATTA TCAGACCTTT ACAAAAATCA GATAA...
```

Podtrženo: Introny A a B v ubichitinové sekvenci
Tučně: Kodon pro glycin76 na konci ORF ubichitinu

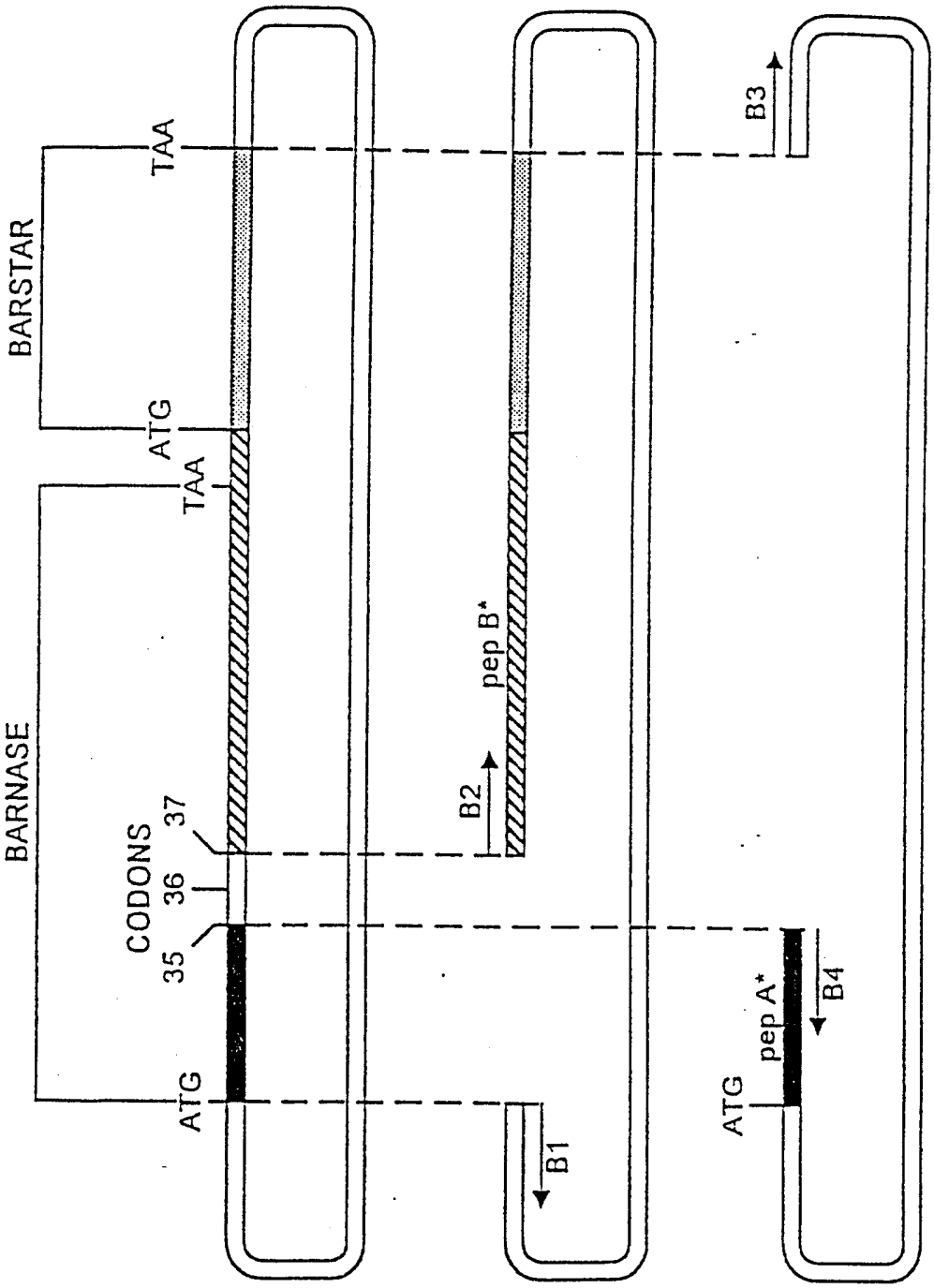
Obr. 1G

DNA sekvence primerů pro IPCR (Příklad 1)

```
B5     5' CACAAGTACTCTAGACCATG 3'          (forward)  "forward" je přímý "levý" primer
B6     5' CATCCAGCCGAGGGCTTGT 3'           (reverse)  "reverse" je zpětný "prvaý" primer

B7     5' GGCGGTGGCGGTTCCG 3'              (forward)
B8     5' CCACTAGTTCTAGAGTACTTGTG 3'  (reverse)

B9     5' GCACAGGTTATCAACACG 3'        (forward)
B10    5' GCGGATCCTCTACATCCAGCCGAGGGCTTGT 3'    (reverse)

B11    5' GCATCAAAAGGGAACC 3'              (forward)
B12    5' GGTCTAGAGTACTTGTG 3'         (reverse)

Ubq16F      5' GCTCTAGACCATGCAGATCTTCGTGAAAAC 3'(forward)
Ubq1R       5' CTGGATCCACCTCTAAGCCTCAACA 3'     (reverse)
Ubq1a       5' TATGGATCCCCCGGGCTGCAGGAA 3'      (forward)
Ubq1b       5' TCCACCTCTAAGCCTCAACAC 3'    (reverse)
```

Obr. 2

Schematické znázornění konstrukce pepA* a pepB* pomocí inverzní PCR (IPCR)



Obr. 3A

In vitro konstrukce S-peptidu, S(+5)proteinu a S-proteinu ze syntetických oligonukleotidů

```
1.   5'-gcggatccATGAAGGAGACCGCC-3OH
2.   5'-gcggatccATGAAGGAGACCGCCGCCGCCAAGTTCGAGCGCCAGCACATGGACAGC-3OH   5P-TAAAGATCTATG...
3.                                                                    3OH-GTACCTGTCG__________ATTTCTAGATAC-5'

4.   5'-ccagatctATG----AGCTCCTCCAACTACTG-3OH
5.   ...AGCACCTCCGCCGCCAGCTCCTCCAACTACTGCAACCAGATGATGAAGTCT-3OH   5P-AGGAACCTGA...
6.                                                              3OH-ACTACTTCAGA__________TCCTTGGACT-5'

7.   ...CCAAGGACAGGTGCAAGCCAGTCAACACCTTCGTCCACGAGAGCCTGGC-3OH   5P-CGATGTCCAG...
8.                                                              3OH-CTCGGACCG__________GCTACAGGTC-5'

9.   ...GCCGTCTGCAGCCAGAAGAACGTGGCCTGCAAGAACGG-3OH   5P-TCAGACCAACT...
10.                                                  3OH-CGTTCTTGCC__________AGTCTGGTTGA-5'

11.  ...GCTACCAGTCCTACAGCACCATGTCCATCACCGACTGCCGCGAGACCGG-3OH   5P-CTCCAGCAAG...
12.                                                            3OH-GCTCTGGCC__________GAGGTCGTTC-5'

13.  ...TACCCTAACTGCGCCTACAAGACCACCCAGGCCAACAAGCACATC-3OH   5P-ATTGTTGCCTG...
14.                                                        3OH-GTTCGTGTAG__________TAACAACGGAC-5'

15.                                          3OH-CTGCGGAGGCAGATTtcctagggc-5'
16.  ...CGAGGGTAACCCTTACGTGCCTGTCCACTTCGACGCCTCCGTCTAAaggatcccg-3OH
```

Obr. 3B

In vitro konstrukce sekvence kódující S-peptid a (Gly4-Ser)3 linker

ze syntetických oligonukleotidů

1. 5'-gcggatccATGAAGGAGACCGCC-3OH
2. 5'-gcggatccATGAAGGAGACCGCCGCCGCCAAGTTCGAGCGCCAGCACATGGACAGC-3OH 5P-GGCGGTGG...
3. 3OH-GTACCTGTCG_____CCGCCACC-5'

4. ...CGGTTCCGGTGGCGGTGGCAGCGGCGGCGGTGGTAGCaagatcttcggg-3OH
5. 3OH-CCATCGttctagaagccc-5'

Obr. 4A

Sekvence DNA a proteinová sekvence S-peptidu s linkerem (Gly4-Ser)3

```
1    ------ --- AAA GAG ACA GCA GCC GCA AAG TTT GAG CGT CAG CAT ATG GAT AGT --- --- --- --- --- ---
2    ------ MET lys glu thr ala ala ala lys phe glu arg gln his met asp ser OCH gly gly gly gly ser
3    ggatcc atg aag GAG acc gcc GCC gcc AAG ttc GAG cgc CAG cac ATG gac agc taa --- --- --- --- ---
4    ggatcc atg aag GAG acc gcc GCC gcc AAG ttc GAG cgc CAG cac ATG gac agc --- ggc ggt ggc ggt tcc

1           --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ------
2           gly gly gly gly ser gly gly gly gly ser ------
3           --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -agatct
4           ggt ggc ggt ggc agc ggc ggc ggt ggt agc aagatct
```

1: Sekvence DNA syntetického genu bovinní RNázy A (kodon 1 až 15) podle publikace N. Vasantha, D. Filpula (1989)
2: Translatovaná sekvence DNA syntetického genu bovinní RNázy A
3: DNA sekvence kódující S-peptid podle předkládaného vynálezu
4: DNA sekvence kódující S-peptid a (Gly4-Ser)3 linker podle vynálezu

Obr. 4B

Sekvence DNA a proteinová sekvence S(+5)-proteinu a S-proteinu

```
1          --- AGC ACC AGT GCT GCC AGT TCT TCC AAC TAC TGT AAC CAG ATG ATG AAG TCT AGA AAC TTG ACC AAG
2          met ser thr ser ala ala ser ser ser asn tyr cys asn gln met met lys ser arg asn leu thr lys
3    agatct atg AGC ACC tcc gcc GCC agc tcc TCC AAC TAC tgc AAC CAG ATG ATG AAG TCT agg AAC ctg ACC AAG
4    agatct atg --- --- --- --- --- agc tcc TCC AAC TAC tgc AAC CAG ATG ATG AAG TCT agg AAC ctg ACC AAG

1              GAC AGA TGT AAG CCA GTT AAC ACA TTT GTC CAC GAG AGT TTG GCT GAT GTC CAA GCC GTC TGC AGT
2              asp arg cys lys pro val asn thr phe val his glu ser leu ala asp val gln ala val cys ser
3              GAC agg tgc AAG CCA gtc AAC acc ttc GTC CAC GAG agc ctg gcc GAT GTC cag GCC GTC TGC agc
4              GAC agg tgc AAG CCA gtc AAC acc tcc GTC CAC GAG agc ctg gcc GAT GTC cag GCC GTC TGC agc

1              CAG AAA AAC GTT GCA TGC AAG AAC GGT CAA ACG AAC TGT TAC CAG AGT TAC AGC ACC ATG TCC ATC
2              gln lys asn val ala cys lys asn gly gln thr asn cys tyr gln ser tyr ser thr met ser ile
3              CAG aag AAC gtg gcc TGC AAG AAC GGT cag acc AAC tgc TAC CAG tcc TAC agc ACC ATG TCC ATC
4              CAG aag AAC gtg gcc TGC AAG AAC GGT cag acc AAC tgc TAC CAG tcc TAC agc ACC ATG TCC ATC

1              ACT GAC TGT CGT GAG ACA GGC TCG AGC AAG TAT CCT AAT TGT GCT TAC AAG ACC ACA CAG GCG AAC
2              thr asp cys arg glu thr gly ser ser lys tyr pro asn cys ala tyr lys thr thr gln ala asn
3              acc GAC tgc cgc GAG acc GGC tcc AGC AAG tac CCT aac tgc gcc TAC AAG ACC acc CAG gcc AAC
4              acc GAC tgc cgc GAG acc GGC tcc AGC AAG tac CCT aac tgc gcc TAC AAG ACC ACA CAG gcc AAC

1              AAA CAC ATC ATT GTT GCT TGT GAA GGT AAC CCT TAC GTT CCT GTC CAC TTT GAC GCC AGT GTT TAA
2              lys his ile ile val ala cys glu gly asn pro tyr val pro val his phe asp ala ser val OCH
3              aag CAC ATC ATT GTT gcc tgc gag GGT AAC CCT TAC gtg CCT GTC CAC ttc GAC GCC tcc gtc TAA
4              aag CAC ATC ATT GTT gcc tgc gag GGT AAC CCT TAC gtg CCT GTC CAC ttc GAC GCC tcc gtc TAA

1              -------
2              -------
3              aggatcc
4              aggatcc
```

1: Sekvence DNA syntetického genu RNázy A (kodon 16 až 124)
podle publikace N. Vasantha, D. Filpula (1989)
2: Translatovaná sekvence DNA syntetického genu bovinní RNázy A
3: DNA sekvence kódující syntetický S(+5)-protein (aminokyselina 16 až 124)
4: DNA sekvence kódující S-protein (aminokyselina 21 až 124)

23.09.99

Obr. 4C

I) PCR amplifikační produkt kódující zaměřovací signál AOX3

XbaI / BglII
tctagatcttaac ATGAAGAATG TTTTAGTAAG GTCAGCTGCG CGAGCTCTGC TTGGCGGCGG
TGGGCGGAGC TACTACCGCC AGCTCTCAAC GGCGGCGATC GTGGAACAGA
GACACCAGCA CGGTGGCGGC GCGTTTGGAA GCTTCCA cttaagcggatcc
AflII / BamHI

II) ORF kódující zaměřovací sekvenci AOX3 (podtržena) a S-peptid

ATGAAGAATG TTTTAGTAAG GTCAGCTGCG CGAGCTCTGC TTGGCGGCGG TGGGCGGAGC
TACTACCGCC AGCTCTCAAC GGCGGCGATC GTGGAACAGA GACACCAGCA CGGTGGCGGC
GCGTTTGGAA GCTTCCACTT AAGAAGGATG AAGGAGACCG CCGCCGCCAA GTTCGAGCGC
CAGCACATGG ACAGCTAA

III) ORF kódující zaměřovací sekvenci AOX3 (podtržena) a S-peptid-(Gly4-Ser)3-GUS

ATGAAGAATG TTTTAGTAAG GTCAGCTGCG CGAGCTCTGC TTGGCGGCGG TGGGCGGAGC
TACTACCGCC AGCTCTCAAC GGCGGCGATC GTGGAACAGA GACACCAGCA CGGTGGCGGC
GCGTTTGGAA GCTTCCACTT AAGAAGGATG AAGGAGACCG CCGCCGCCAA GTTCGAGCGC
CAGCACATGG ACAGCGGCGG TGGCGGTTCC GGTGGCGGTG GCAGCGGCGG CGGTGGTAGC
GGGATCCCCG GGTACGGTCA GTCCCTTATG --> GUS

IV) ORF kódující zaměřovací sekvenci AOX3 (podtržena) a S-protein

ATGAAGAATG TTTTAGTAAG GTCAGCTGCG CGAGCTCTGC TTGGCGGCGG TGGGCGGAGC
TACTACCGCC AGCTCTCAAC GGCGGCGATC GTGGAACAGA GACACCAGCA CGGTGGCGGC
GCGTTTGGAA GCTTCCACTT AAGAAGGATG AGCTCCTCCA ACTACTGCAA CCAGATGATG
AAGTCTAGGA ACCTGACCAA GGACAGGTGC AAGCCAGTCA ACACCTCCGT CCACGAGAGC
CTGGCCGATG TCCAGGCCGT CTGCAGCCAG AAGAACGTGG CCTGCAAGAA CGGTCAGACC
AACTGCTACC AGTCCTACAG CACCATGTCC ATCACCGACT GCCGCGAGAC CGGCTCCAGC
AAGTACCCTA ACTGCGCCTA CAAGACCACA CAGGCCAACA AGCACATCAT TGTTGCCTGC
GAGGGTAACC CTTACGTGCC TGTCCACTTC GACGCCTCCG TCTAA

V) Translační fúze genomové sekvence ubichitinu a ORF pro S-protein

ATGCAGATCT TCGTGAAAAC CTTGACCGGC AAGACCATCA CTCTCGAGGT CGAGAGCAGC
GACACCATCG ACAATGTCAA GGCCAAGATC CAAGACAAAG AAGGTATCAT TCTTCCTCAC
TCAATCTGGA TTCTTCTCTT TAGCTTTTTG AAATTCAGAT CTCTTATCAT TTACTTGTTT
CTCCTTTAAG GAATCCCTCC GGATCAGCAG AGATTGATCT TCGCCGGAAA GCAGCTCGAA
GATGGCCGTA CTTTGGCTGA CTACAACATC CAGAAAGGTA CGAAATCATC CGAATCCTTC
TGTTGATCAT TTCGATGATC TGATTGTATA AACTCTAATG GATTGTTATC ATTTGTAAAC
AGAATCTACA CTTCATCTTG TGTTGAGGCT TAGAGGtGGa tcCagCTCCA ACTACTGCAA
CCAGATGATG AAGTCTAGGA ACCTGACCAA GGACAGGTGC AAGCCAGTCA ACACCTCCGT
CCACGAGAGC CTGGCCGATG TCCAGGCCGT CTGCAGCCAG AAGAACGTGG CCTGCAAGAA
CGGTCAGACC AACTGCTACC AGTCCTACAG CACCATGTCC ATCACCGACT GCCGCGAGAC
CGGCTCCAGC AAGTACCCTA ACTGCGCCTA CAAGACCACA CAGGCCAACA AGCACATCAT
TGTTGCCTGC GAGGGTAACC CTTACGTGCC TGTCCACTTC GACGCCTCCG TCTAA

Podtrženo: introny A a B ubichitinové sekvence
Tučně: kodon pro glycin76, označující C-konec ubichitinu
Malá písmena: Změny konzervativních kodonů zavedené pomocí PCR, které vytvořily místo BamHI a modifikovaly využití kodonů

Obr. 4D

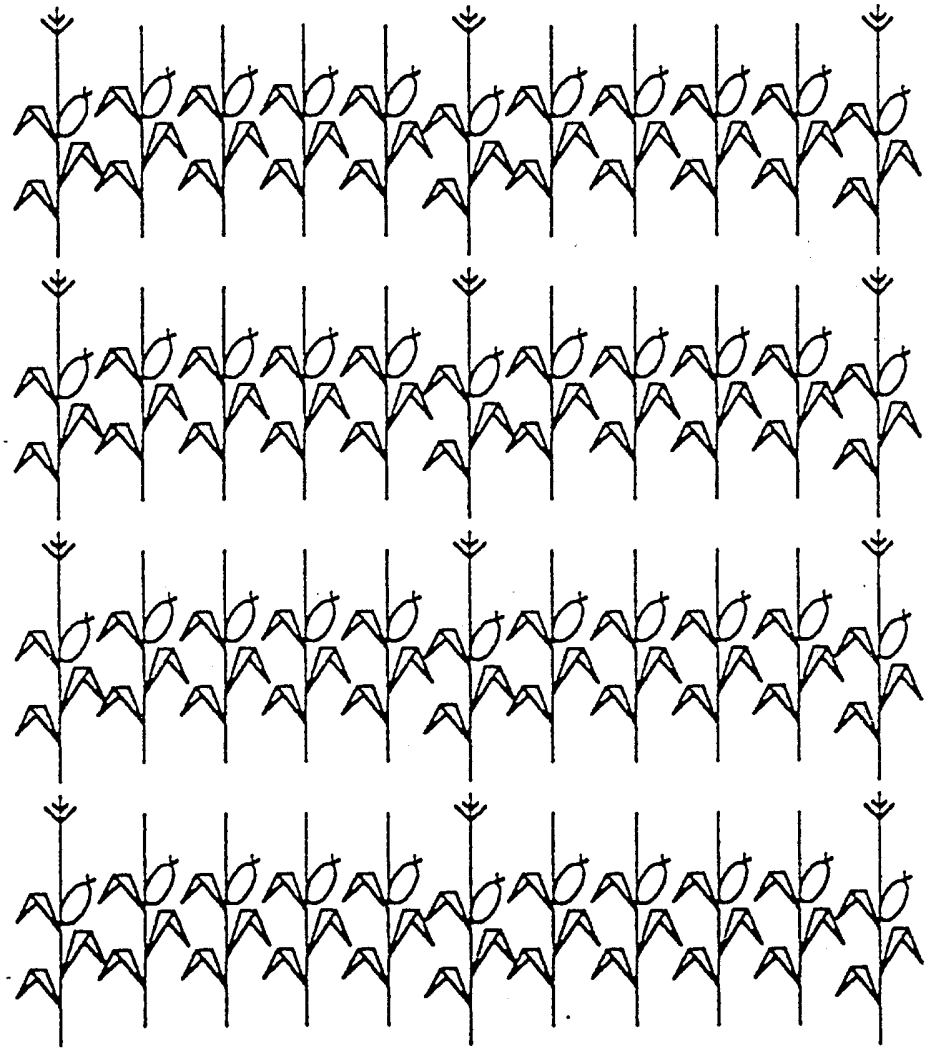
Nukleotidové sekvence primerů pro IPCR (Příklad 3)

Sprot F	5'	GGTGGATCCAGCTCCAACTACTGCAAC 3'
Sprot R	5'	CGGGATCCTTAGACGGAGGCGTCG 3'
SprotMI1	5'	GTCCTTAAGAAGGATGAGCTCCTCCAACTAC 3'
SprotMI2	5'	CGGGATCCTTAGACGGAGGCGTCG 3'
SpepMI1	5'	GTCCTTAAGAAGGATGAAGGAGACCGCCG 3'
SpepMI2	5'	TCGGGATCCTTAGCTGTCCATGTGCTG 3'
SpepGMI2	5'	TCGGGATCCTCATTGTTTGCCTCCCTG 3'
AOX3MI1	5'	TGCTCTAGATCTTAACATGAAGAATGTTTTAG 3'
AOX3MI2	5'	TCGGATCCGCTTAAGTGGAAGCTTCCAAAC 3'

Obr. 5

Schema produkce kukuřičného zrna bez zárodků:

Linie A B jsou vysety ve střídavých řadách (např. jedna samčí a 4 samičí rostliny)





samčí rodičovská rostlina A



samičí rodičovská rostlina B