

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

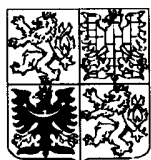
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

698-99

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **07. 07. 98**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **08.07.97**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **97/889655**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11. 08. 99**
(Věstník č. 8/99)

(86) PCT číslo: **PCT/US98/14109**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 99/02655**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N	5/04
C 12 N	5/10
C 12 N	5/16
C 12 N	5/22
C 12 N	15/82
A 01 H	5/00

(71) Přihlášovatel:

UNIVERSITY OF KENTUCKY RESEARCH
FOUNDATION, Lexington, KY, US;

(72) Původce:

Lusso Marcos Fernando Godoy, Lexington,
KY, US;

Chappel Joseph, Lexington, KY, US;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1,
Praha 4, 14000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Izolované polynukleotidy, jimi kódované
proteinkinázy, je obsahující konstrukty a
transgenní rostliny a způsob jejich použití**

(57) Anotace:

Jsou popsány molekuly nukleových kyseliny, které jsou indukovány při vniku patogena nebo působení elicitoru. Takové molekuly jsou funkční v rostlinách, rostlinných pletivech a rostlinných buňkách pro indukovanou genovou expresi a změnu fenotypického vyjádření rezistence k nemocem v rostlinách. Takovéto molekuly odpovídají nebo jsou příbuzné sekvenci genů proteinkináz závislých na vápníku. Jsou také popsány způsoby vytvoření transgenních rostlin, které obsahují takovéto molekuly nukleových kyselin, a způsoby použití takovýchto molekul, jakož i polypeptidy, kódované takovými nukleovými kyselinami.

CZ 698-99 A3

Izolované polynukleotidy, jimi kódované proteinkinázy, je obsahující konstrukty a transgenní rostliny a způsob jejich použití.

Oblast techniky

Tento vynález se týká nukleových kyselin, kódujících proteinkinázy závislé na vápníku, polypeptidů vytvořených z takovýchto nukleových kyselin a transgenních rostlin, které exprimují takovéto nukleové kyseliny.

Dosavadní stav techniky

U rostlin je rezistence k houbovým, bakteriálním a virovým patogenům spojena s reakcí rostliny, která se nazývá hypersenzitivní reakce (HR). Při HR dochází v místě, kde vniká potenciální fytopatogen, k lokalizované buněčné smrti. Předpokládá se, že tato lokalizovaná smrt rostlinných buněk zahrnuje vnikající mikroorganismy nebo viry a tím ochraňuje zbytek rostliny. Jiné obranné reakce rostliny zahrnují produkci fytoalexinů, produkci lytických enzymů schopných zamezení vstupu patogena a modifikace buněčné stěny, které ji zpevní proti fyzickému a/nebo enzymatickému působení.

HR rostlin může jako součást reakce na vnikající mikroorganismus zahrnovat produkci fytoalexinů. Například, tabák (*Nicotiana tabacum*) produkuje v reakci na vnikající mikroorganismy, např. *Pseudomonas lychrymans*, seskviterpeny.

Mnohé sloučeniny mohou sloužit jako elicitory syntézy rostlinných fytoalexinů. Tyto zahrnují jeden nebo více toxických iontů., např. měďnaté ionty, jiné chemicky definované sloučeniny, metabolické inhibitory, glykany buněčné stěny, určité glykoproteiny, určité

enzymy, spóry hub, chitosany, určité mastné kyseliny a určité oligosacharidy odvozené od rostlinných buněčných stěn. Viz. např., Sequira I. (1983) Annu. Rev. Microbiol. 37 : 51-79 a odkazy zde citované. Fragmenty buněčné stěny určitých druhů *Phytophthora* a celuláza z *Trichoderma viride*, ale na pektolyáza z *Aspergillus japonicum*, mohou také vyvolat HR. HR může být také indukována útokem jiných rostlinných patogenů nebo avirulentních příbuzných kmenů.

Elicitiny jsou proteiny produkované rostlinnými patogeny a potenciálními rostlinnými patogeny. Elicitiny mohou indukovat HR v rostlinách. Obecně, ale ne nutně, je lokalizovaná buněčná smrt výsledkem elicitem-indukované reakce v infikovaném (nebo napadeném) rostlinném pletivu. Tyto reakce zprostředkovávají úplnou nebo částečnou rezistenci k ničivé infekci vnikajícími potenciálními rostlinnými patogenními mikroorganismy. Aminokyselinové a nukleotidové kódující sekvence elicitu z *Phytophthora parasitica* byly publikovány. Kamoun et al., (1993) Mol. Plant-Microbe Interactions 6 : 573-581.

Rostlinné patogenní viry, včetně viru mozaiky tabáku (TMV), indukují v infikovaných rostlinách HR. Bakterie, které infikují rostliny, mohou také indukovat HR a tím rezistenci; mezi představitele bakterií vyvolávající HR patří např. *Xanthomonas spp.* a *Pseudomonas syringae*. Rostlinné patogenní houby obecně neindukují HR po útoku na hostitelskou rostlinu, např. *Phytophthora parasitica* a *Peronospora tabaci* na hostitelském tabáku, ale mohou indukovat HR po útoku na nehostitelské rostlině.

Mechanismy signální transdukce, zahrnuté ve fungování této rezistence k nemocem, se stále zkoumají a některé genetické a biochemické rysy byly již načrtnuty. Viz např. Staskawicz B., et al.,

Science 268 : 661-667 (1995). Avšak stále ještě nebylo pochopeno mnoho aspektů drah signální transdukce a role mnoha jeho specifických složek.

V oboru již dlouhou dobu existuje potřeba způsobů ochrany rostlin, obzvláště zemědělských plodin, proti infekci rostlinnými patogeny. Z hlediska hospodářských zájmů a zájmů životního prostředí jsou spíše než způsoby, které jsou závislé na aplikaci chemikálií na zemědělské plodiny, důležité zejména biologické nebo „přírodní“ způsoby. V oboru existuje také potřeba rostlinných polynukleotidových sekvencí pro zesílení a/nebo zlepšení rezistence k nemocem u rostlin.

Podstata vynálezu

Nukleové kyseliny předkládaného vynálezu jsou založeny na nových genech proteinkináz závislých na vápníku (CDPK) a jim odpovídajících proteinech. Indukce exprese těchto nových CDPK genů je překvapivě rychlá, to jest transkripce takovýchto genů může být pozorována již 30 minut po elicitorem zprostředkovaná indukci rostlinné obranné reakce. Nové, zde popsané geny jsou tedy mezi těmi geny, které jsou nejrychleji indukované v reakci na signály naznačující vnikání rostlinných patogenů.

Je zde popsán izolovaný polynukleotid, který zahrnuje nukleotidovou sekvenci SEK I. Č. : 1 a její komplement a RNA analog SEK. I. Č. : 1 nebo jeho komplement. Těmito polynukleotidy mohou také být fragmenty zmíněných nukleových kyselin, které jsou dlouhé alespoň 20 nukleotidů a které hybridizují za přísných (stringentních) podmínek s genomovou DNA, která kóduje polypeptid, který je na obrázku 3. Tento polynukleotid může obsahovat např. nukleotidy 1 až 170, nukleotidy 160 až 560 nebo nukleotidy 550 až 920 z obrázku 2.

Konstrukt nukleové kyseliny, jak je zde popsán, obsahuje polynukleotid tohoto vynálezu. V takovémto konstruktu může být polynukleotid tohoto vynálezu operativně spojen s jedním nebo více úseky, které regulují transkripci tohoto polynuklotidu, např. regulačním úsekem, indukovaným v reakci na rostlinné patogeny, jako jsou houby (např. *Phytophthora*), bakterie (např. *Pseudomonas*) nebo viry (např. virus mozaiky tabáku), jak je zde popsáno. V jiných provedeních je tato indukce zprostředkována nějakým elicitorem (např. houbovými nebo bakteriálními elicitory).

Dalšími předměty předkládaného vynálezu jsou transgenní rostliny, jejich buňky a pletiva, které byly geneticky upraveny tak, aby obsahovaly a exprimovaly polynukleotid tohoto vynálezu, např. kódující sekvenci nebo antisense sekvenci. Konstrukt může dále obsahovat regulační úseky operativně spojené s polynukleotidem, např. indukovatelný regulační úsek. Tato rostlina může být dvouděložná např. z čeledi *Solanaceae* jako např. *Nicotiana tabacum*. Tato rostlina může být také jednoděložná, krytosemenná nebo jehličnan.

Je zde popsána taková transgenní rostlina, která obsahuje polynukleotid exprimující polypeptid, který má od asi 250 do 550 aminokyselin. Tento polypeptid obsahuje aminokyselinovou sekvenci, která je v podstatě identická s aminokyselinovou sekvencí na obrázku 3.

Je zde popsán způsob použití tohoto polynukleotidu. Součástí tohoto způsobu je hybridizace zde diskutovaného polynukleotidu s DNA nebo RNA z nějaké rostliny. Tento způsob může dále zahrnovat kroky identifikace úseku rostlinné DNA nebo RNA, která je z asi 70 nebo více procent shodná s tímto polynukleotidem, a kroky klonování alespoň části tohoto úseku DNA nebo RNA. Tato klonovaná část může

dále obsahovat DNA, sousedící s tímto úsekem, který je sekvenčně shodný ze 70 nebo více procent.

Z jiného pohledu je součástí tohoto vynálezu způsob změny rezistence k nemocem u rostliny. Tento způsob obsahuje kroky zavedení polynukleotidu tohoto vynálezu do rostlinné buňky a tvorbu rostlin, které obsahují tento polynukleotid, z těchto buněk. Expresí tohoto polynukleotidu změni rezistenci k nemocem v této rostlině. Např. konstrukt nukleové kyseliny může dále obsahovat indukovatelný regulační úsek, který je operativně spojen s tímto polynukleotidem, a exprese může být indukována pomocí tohoto regulačního úseku při vystavení rostliny nějakému elicitoru nebo rostlinnému patogenu.

Z jiného pohledu je součástí tohoto vynálezu izolovaný polypeptid, který má od asi 250 do asi 550 aminokyselin a obsahuje aminokyselinovou sekvenci, která je v podstatě identická s obrázkem 3.

Indukovatelným regulačním úsekem je DNA sekvence, která je účinná při regulaci exprese nějakého polynukleotidu, který je s tímto regulačním úsekem operativně spojen. Např. produkt genu CDPK, spojený s rostlinnou obranou reakcí (např. hypersensitivní reakcí) může být operativně spojen s vývojově řízeným regulačním úsekem. Tento termín také zahrnuje regulační úseky, které jsou dostatečné k tomu, aby byla genová exprese indukovatelná v reakci na vnější signály nebo látky spojené s nemocí (např. patogenem nebo elicitorem indukované signály nebo látky, jak je zde popsáno). Tento termín také zahrnuje ty regulační úseky, které sousedí s novým CDPK genem a jsou zahrnuty v rychlé indukci transkripce takového nového genu. Obecně, regulační úseky obranné reakce jsou umístěny ve směru 5' od kódujícího úseku genu, ale toto není omezující.

„Pletivově specifický“ znamená schopný přednostně zvyšovat expresi

produktu genu (např. molekuly mRNA nebo polypeptidu) v jednom pletivu (např. xylému) ve srovnání s jiným pletivem (např. floémem). „Buněčně specifický“ znamená schopný přednostně zvyšovat expresi produktu genu (např. molekuly mRNA nebo polypeptidu) v jedné buňce (např. parenchymatické buňce) ve srovnání s jinou buňkou (např. epidermální buňkou).

„Patogen“ je organismus jehož infekcí nebo spojením s ním může u životaschopných buněk dojít ke vzniku nemoci. „Elicitor“ je jakákoliv molekula, která je schopná spuštění rostlinné obranné reakce. Příklady elicitorů mohou být jeden nebo více toxických iontů., např. měďnaté ionty, jiné chemicky definované sloučeniny, metabolické inhibitory, glykany buněčné stěny, určité glykoproteiny, určité enzymy, spóry hub, chitosany, určité mastné kyseliny a určité oligosacharidy odvozené od rostlinných buněčných stěn a elicitiny (např. harpin, kryptogein a parasiticein).

„Operativně spojený“ znamená, že dva polynukleotidy jsou spojeny takovým způsobem, který umožňuje, aby oba tyto polynukleotidy dosáhly požadované funkční aktivity. Např. spojení indukovatelné regulační sekvence a kódující sekvence, aby byla dosažena genová exprese za přítomnosti vhodných molekul induktoru.

Jestliže není uvedeno jinak, mají všechny zde použité technické a vědecké termíny stejný význam, který se jimi běžně rozumí v oboru, do kterého tento vynález patří. Ačkoliv mohou být v praktikování nebo testování předkládaného vynálezu použity materiály nebo metody, které jsou stejné nebo ekvivalentní těm zde popsaným, vhodné metody a materiály jsou popsány níže.

Všechny publikace, patentové přihlášky, patenty a jiné zde zmíněné odkazy jsou zde zahrnuty ve své úplnosti. V případě sporu bude tento popis, včetně definic, kontrolován. Dále, materiály, metody a příklady

jsou pouze ilustrativní a nejsou považovány za omezující.

Jiné znaky a výhody tohoto vynálezu, které budou zřejmé z následujícího popisu jeho upřednostňovaných provedení, jsou součástí nároků.

Detailní popis vynálezu

Předkládaný vynález se týká izolovaných polynukleotidů (nukleových kyselin), které jsou indukované v rostlinách, při reakci na vniknutí možného rostlinného patogena a/nebo působení elicitoru nebo elicitor napodobujících chemických signálů. Takové nukleové kyseliny obvykle kódují polypeptid proteinkinázy závislé na vápníku (CDPK) nebo CDPK-příbuzný polypeptid. Indukce nových, zde popsanych, polynukleotidů v čase odpovídá indukci genů rostlinné obranné reakce, kdežto ostatní CPDK geny se jeví být indukovány pomaleji. Indukce genové exprese takovýchto nových genů je rychlejší, než indukce genů, které jsou zahrnuty ve vývojově řízených procesech, např. vývojově řízených procesech jako je vývoj květu. Indukce těchto nových CDPK genů, zde uvedených, je také rychlejší než indukce mnoha genů zahrnutých v reakci na abiotický stres, jako např. stres způsobený vodou nebo solemi.

Polynukleotidy předkládaného vynálezu mohou být ve formě RNA nebo ve formě DNA, včetně cDNA, syntetické DNA nebo genomové DNA. Tato DNA může být dvouřetězcová nebo jednořetězcová. V případě, že je jednořetězcová, to může být kódující řetězec nebo nekódující řetězec. RNA analog SEK. I. Č. : 1 může být např. mRNA nebo kombinace ribo- a deoxyribonukleotidů.

Polynukleotid předkládaného vynálezu může kódovat polypeptid, jehož součástí je aminokyselinová sekvence, která je velmi podobná nebo identická se sekvencí na obr. 3. V některých provedeních může

být polynukleotid obměnou nukleové kyseliny, uvedené v SEK.I. Č. : I, např. může mít odlišnou nukleotidovou sekvenci, která díky tomu, že genetický kód je degenerovaný, kóduje stejnou aminokyselinovou sekvenci jako polypeptid na obrázku 3.

Polynukleotid vynálezu může dále obsahovat přídavné sekvence. Například, N-terminální konec polypeptidu, který obsahuje aminokyselinovou sekvenci uvedenou na obrázku 3, může být fúzován ve čtecím rámci s fragment nukleové kyseliny, která kóduje sekreční nebo vedoucí (leader) aminokyselinou sekvenci. V oboru jsou známy další fragmenty nukleových kyselin, které kódují aminokyselinové sekvence, vhodné pro fúzi ve čtecím rámci se zde uvedenými CDPK polypeptidy. Viz např. U. S. 5 629 193. Polynukleotid může dále obsahovat jeden nebo více regulačních úseků, operativně spojených se zde uvedeným polynukleotidem.

Součástí překládaného vynálezu jsou také polynukleotidy, které selektivně hybridizují se zde uvedenou CPDK polynukleotidovou sekvencí. Hybridizace může zahrnovat Southernovu analýzu (Southern blotting), to jest metodu, pomocí které lze identifikovat přítomnost DNA sekvence v směsi cílové nukleové kyseliny na základě její hybridizace se značeným oligonukleotidem nebo sondou, kterou tvoří fragment DNA. Southernova analýza typicky zahrnuje elektroforetickou separaci štěpením vzniklých DNA fragmentů na agarózových gelech, denaturaci DNA po elektroforetické separaci a přenos DNA na nitrocelulózový, nylonový nebo jiný vhodný membránový podklad pro analýzu sondou, která je značena radioaktivně, biotinem nebo enzymově, jak jest popsáno v částech 9.37-9.52 Sambrook et al., (1989) Molecular cloning, druhé vydání, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY.

Polynukleotid může se zde uvedeným polynukleotidem hybridizovat

za málo přísných podmínek nebo za velmi přísných podmínek. Velmi přísné podmínky se používají pro nalezení nukleových kyselin, které mají vysoký stupeň homologie nebo jsou sekvenčně totožné se sondou. Za velmi přísných podmínek mohou být během hybridizace použity denaturační činidla jako např. formamid. Příkladem je 50% formamid s 0,1% hovězím sérovým albuminem / 0,1% fikolem / 0,1% polyvinylpyrrolidonem / 50 mM pufrém fosforečnanu sodného při pH 6,5 s 750 mM NaCl a 75 mM citran sodný při 42 °C. Dalším příkladem je použití 50% formamidu, 5 x SSC (0,75 M NaCl, 0,075 M citran sodný, 50 mM fosforečnan sodný (pH 6,8), 0,1% pyrofosforečnan sodný, 5 x Denhardtův roztok, DNA sonikovaných lososích spermií (50 µg/ml), 0,1% SDS a 10% dextransulfát při 42 °C s promýváním při 42 °C v 0,2 x SSC a 0,1% SDS.

Alternativou je použití nízké iontové síly a vysoké teploty při promývání, např. 0,015 M NaCl / 0,0015 M citran sodný (0,1 x SSC); 0,1% laurylsulfát sodný (SDS) při 65 °C.

Málo přísné podmínky jsou takové hybridizační podmínky, které se používají pro nalezení nukleových kyselin, které mají se sondou menší homologii nebo totožnost, než mají nukleové kyseliny nalezené za velmi přísných podmínek. Za málo přísných podmínek mohou být použity vyšší iontové síly a/nebo nižší teploty při promývání hybridizační membrány, ve srovnání s iontovou silou a teplotami, použitými při hybridizaci za velmi přísných podmínek. Např. promývací roztok, obsahující 0,060 M NaCl / 0,0060 M citran sodný (0,4 x SSC) a 0,1% laurylsulfát sodný (SDS), může být použit při 50 °C, s alespoň jedním promýváním v 1x SSC při 65 °C. Alternativou je použití promývání v 1 X SSC při 37 °C.

Hybridizace může být také provedena pomocí northernové analýzy (northern blotting), metody, používané pro vyhledání RNA, která

hybridizuje se sondou. Sonda je značena radioizotopem, např. ^{32}P , biotinem nebo enzymem. Analyzovaná RNA může být elektroforeticky rozdělena na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu, přenesena na nitrocelulózovou, nylonovou nebo jinou vhodnou membránu a hybridizována se sondou, za použití v oboru dobře známých standardních technik jako např. těch, popsanych v částech 7,39 - 7,52 Sambrook et al., supra.

Obecně je upřednostňováno použití sond, které jsou dlouhé alespoň 20 nukleotidů, lépe alespoň 50 nukleotidů a nejlépe alespoň 100 nukleotidů. Je-li použita relativně krátká sonda, její sekvence přednostně neobsahuje konzervované úseky CDPK genů (proteinkinázovou doménu a doménu vázající vápník), za účelem snadnějšího rozpoznání zde uvedených rychle indukovaných CDPK genů od pomalu indukovaných CDPK genů, konstitutivních CDPK genů či nízkoúrovňových konstitutivních CDPK genů. Nicméně, sondy, které takovéto konzervované úseky obsahují, mohou být použity, jestliže obsahují také dostatečně dlouhé nekonzervované úseky, které jsou specifické pro zde uvedené nové polynukleotidy.

Polynukleotid tohoto vynálezu je alespoň z asi 70 % sekvenčně totožný, přednostně alespoň z asi 80 % sekvenčně totožný a lépe alespoň z asi 90 % sekvenčně totožný se SEK. I. Č. : 1. Sekvenční totožnost může být určena např. pomocí počítačových programů, vytvořených tak, aby provedly jednoduchá nebo vícenásobná seřazení sekvencí. Polynukleotidy, které jsou z asi 70 % nukleotidové sekvence totožné s polynukleotidem, který má SEK. I. Č. : 1, jsou součástí vynálezu a mohou být identifikovány hybridizací za málo přísných podmínek. Polynukleotidy, které jsou alespoň z asi 80 % sekvenčně totožné, nebo alespoň z asi 90 % sekvenčně totožné nebo alespoň z asi 95 % sekvenčně totožné polynuklotidem, který má SEK.

I. Č. : 1, mohou být identifikovány hybridizací za velmi přísných podmínek.

Polynukleotidy tohoto vynálezu mohou být získány chemickou syntézou, izolací a klonováním z rostlinné genomové DNA, nebo jinými v oboru známými způsoby, včetně polymerázové řetězové reakce (PCR), která je provedena za použití oligonukleotidů, odpovídajícím částem SEK.I. Č. : I. Jako PCR se označuje postup nebo technika, kde je cílové nukleová kyselina amplifikována podobným způsobem, jako je ten, popsáný v U. S. Patent No. 4 683 195, který je zde zahrnut odkazem, a následné modifikace tohoto zde popsaného postupu. Obecně, sekvence konců úseku zájmu nebo sekvence za nimi se využívají pro navržení oligonukleotidových primerů, které jsou sekvenčně identické nebo podobné protilehlým řetězcům templátu, který má být amplifikován. PCR může být použita pro amplifikaci specifických sekvencí RNA, specifických sekvencí DNA z totální genomové DNA a cDNA, transkribované z totální buněčné RNA, bakteriofágových nebo plazmidových sekvencí apod. Alternativou je prohledávání knihovny cDNA (v expresním vektoru) pomocí CDPK-specifické protilátky, připravené za použití peptidové sekvence (sekvencí) z hydrofilních úseků CDPK sekvence na obrázku 3 a postupu, známého v oboru.

Nové polynukleotidy tohoto vynálezu mohou být nalezeny v podstatě u všech rostlin, včetně rostlin z čeledi *Leguminaceae* (např. soji), z čeledi *Solanaceae* (např. *N. tabacum*), z čeledi *Brassicaceae* (např. *Arabidopsis thaliana*) a z čeledi *Graminaceae* (např. *Zea mays*). Polynukleotidy tohoto vynálezu jsou přednostně vybrány z čeledi *Solanaceae*.

V některých provedeních je polynukleotid tohoto vynálezu identifikován a izolován z rostliny na základě homologie nukleotidové

sekvence a na základě rychlé indukce exprese po působení elicitoru nebo patogena. Např. DNA:DNA hybridizace za málo až velmi přísných podmínek, za použití zde uvedené polynukleotidové sondy, umožňuje nalezení odpovídajících genů z jiných rostlinných druhů. Použití cílové nukleové kyseliny (např. cDNA), připravené z pletiva krátce po indukci obranné reakce usnadňuje izolaci zde uvedených nových polynukleotidů, protože takovéto polynukleotidy jsou obvykle indukovány rychleji než jiné CDPK geny.

Konstrukt nukleové kyseliny obsahuje zde uvedený polynukleotid, který je typicky spojen s jiným, odlišným, polynukleotidem. Například, CDPK kódující sekvence plné délky může operativně fúzována ve čtecím rámci s fragmentem nukleové kyseliny, která kóduje vedoucí sekvenci, sekreční sekvenci nebo jiné přídatné aminokyselinové sekvence, které mohou být užitečně spojené s polypeptidem nebo peptidovým fragmentem.

V některých provedeních zahrnuje konstrukt nukleové kyseliny polynukleotid tohoto vynálezu, operativně spojený s alespoň jednou vhodnou regulační sekvencí ve stejné nebo obrácené orientaci. Regulační sekvence obvykle sami nekódují genové produkty. Místo toho, působí regulační sekvence na úroveň exprese kódující sekvence. Příklady regulačních sekvencí jsou v oboru dobře známy a zahrnují, ne pouze, minimální promotory a promotory genů, které jsou indukovány v reakci na elicitory. Přirozené regulační sekvence zde uvedených polynukleotidů mohou být odborníky snadno izolovány a použity v konstruktech tohoto vynálezu. Jinými příklady vhodných regulačních sekvencí jsou enhancery či enhancerům podobné úseky, introny, 3'- nekódující oblasti jako poly A sekvence a jiné zde diskutované regulační sekvence. Techniky molekulární biologie pro přípravu chimerních genů jsou v oboru známy.

Polypeptidy tohoto vynálezu mají od asi 250 do asi 550 aminokyselin, např. od asi 300 aminokyselin do asi 508 aminokyselin, od asi 308 aminokyselin do asi 500 aminokyselin. Polypeptidy tohoto vynálezu typicky obsahují proteinkinázové domény, stejně jako domény obsahující vazebné místo pro vápník. Takovéto domény zahrnují např. aminokyseliny 2 až 7, 42 až 49, 191 až 202, 227 až 238, 264 až 274 a 297 až 307 na obrázku 3.

Aminokyselinové sekvence tohoto polypeptidu mohou zahrnovat vyvozenou aminokyselinovou sekvenci z obrázku 3. V jiných provedeních zahrnuje polypeptid tohoto vynálezu aminokyselinovou sekvenci, která je v podstatě identická se sekvencí na obrázku 3, např. z asi 80 % či více, nebo z asi 90 % či více, nebo z 95 % či více. Obecně, konzervativní aminokyselinové substituce nebo substituce podobných aminokyselin, které neovlivňují funkci proteinu, jsou tolerovány. Podobné aminokyseliny jsou takové aminokyseliny, které mají podobnou velikost a/nebo nábojové vlastnosti. Například, izoleucin a valin jsou podobné aminokyseliny. Podobnost mezi páry aminokyselin byla v oboru stanovena řadou způsobů. Například, Dayhoff et al. (1978) v Atlas of Protein Sequence and Structure, díl 5, dodatek 3, str. 345-352, poskytuje tabulky četnosti substitucí aminokyselin, které mohou být použity jako měřítko aminokyselinové podobnosti. Proteinkinázové domény a domény obsahující vazebné místo pro vápník mohou být upraveny konzervativními substitucemi, ale obecně jsou zachovány beze změn v aminokyselinové sekvenci.

„Izolovaný“ polypeptid je exprimován a produkován takovým způsobem a v takovém prostředí, které jsou odlišné od způsobu a prostředí, ve kterém je polypeptid přirozeně exprimován a produkován. Například, polypeptid je izolován, když je exprimován a produkován v bakterii v bakteriích nebo houbách. Podobně, polypeptid

je izolován, když je gen, který ho kóduje, operativně spojen s chimerním regulačním úsekem a když je exprimován v pletivu nebo druhu, kde tento polypeptid není přirozeně exprimován. Dále, polypeptid je izolován, když je gen, který ho kóduje, operativně spojen s chimerním regulačním úsekem a když je exprimován v pletivu nebo druhu, kde je tento polypeptid přirozeně exprimován, ale ve větších množstvích. Polypeptid tohoto vynálezu může být také izolován standardními purifikačními metodami tak, aby byl získán v asi 80% či vyšší čistotě, nebo 90% či vyšší čistotě, nebo 95% či vyšší čistotě.

V některých provedeních je polypeptid tohoto vynálezu analogem nebo variantou polypeptidu, který zahrnuje vyvozenou aminokyselinovou sekvenci z obrázku 3.

Takováto analoga a varianty zahrnují, např. přirozeně se objevující alelické varianty, nepřirozeně se objevující alelické varianty, deleční varianty a inserční varianty, které se podstatně funkčně neliší od polypeptidu.

Polypeptid tohoto vynálezu může obsahovat sekvenci ukázanou na obrázku 3 a rovněž boční C-terminální a N-terminální sekvence, kódované stejným genem jako je ten, který obsahuje nukleotidovou sekvenci SEK. I. Č. I. Alternativou je produkce chimerního polypeptidu z genu, kde jsou spojeny ve čtecím rámci nukleotidy z 5'oblasti jednoho CDPK genu s nukleotidy z 3'oblasti druhého CDPK genu a tím vzniká chimerní gen, který kóduje chimerní polypeptid. Ilustrativním příkladem chimerního CDPK polypeptidu je polypeptid, který je exprimován polynukleotidem, který kóduje aminokyseliny 1 až 156 z N-terminální oblasti CDPK genu soji (obr. 4), po nichž následuje aminokyselinová sekvence z obr. 3 a dále aminokyseliny 465 až 508 z C-terminální části stejného CDPK genu soji, kde všechny

jsou fúzované ve čtecím rámci.

Transgenní rostlina tohoto vynálezu obsahuje konstrukt nukleové kyseliny, jak je zde popsán. Takovýto konstrukt je zaveden do rostlinné buňky a je získána alespoň jedna transgenní rostlina. Semena produkovaná transgenní rostlinou se pro získání rostlin, homozygotních v tomto konstruktu, mohou nechat vyrůst a samoskřížit (nebo skřížit a samoskřížit). Semena mohou být analyzována za účelem nalezení těch homozygotů, u kterých dochází k požadované expresi tohoto konstrukt. Transgenní rostliny mohou být zavedeny do programu pěstování, za účelem např. přírůstku semen, zavedení těchto nových konstruktů do jiných linií nebo druhů nebo další selekce jiných požadovaných rysů. Druhou možností je získání transgenních rostlin vegetativním rozmnožováním transformovaných rostlinných buněk, u těch druhů, u kterých se tyto techniky dají provádět.

Když je zde použit, označuje termín transgenní rostlina také potomstvo původní transgenní rostliny. Potomstvo zahrnuje potomky konkrétních rostlin nebo buněčných linií, např. semena vyvinutá na běžné rostlině. Potomstvo běžné rostliny také zahrnuje semena vzniklá na rostlinách F_1 , F_2 , F_3 a následných generací, nebo semena vzniklá na rostlinách B_1 , B_2 , B_3 a následných generací.

V některých provedeních obsahují transgenní rostliny konstrukt, který zahrnuje polynukleotid tohoto vynálezu, operativně spojený v sense orientaci se vhodným regulačním úsekem, takže je produkována sense mRNA. Je-li to požadováno, může být do tohoto konstrukt začleněn gen pro selektovatelný marker za účelem usnadnění identifikace transformovaných buněk nebo pletiv.

Inhibice těchto nových CDPK genů v rostlinách je také užitečná. Například inhibice exprese CDPK genu krátce před sklizní semen může umožnit snadnější vnik rostlinných patogenů do rostlinných

vegetativních pletiv a tím snížení rostlinné biomasy, která brání mechanickému sklizení semen. Regulovaná inhibice exprese genu CDPK může být dosažena pomocí operativního spojení polynukleotidu tohoto vynálezu v antisense orientaci se vhodným indukovatelným regulačním úsekem. Viz např. U.S. Patent 5 453 566. Stejného efektu se dá dosáhnout kosupresí, to jest, exprese celé nebo části kódující sekvence nového CDPK genu v sense orientaci může potlačit odpovídající endogenní CDPK geny. Viz např. WO 94/11516.

V některých provedeních zahrnuje konstrukt zde popsáný polynukleotid, operativně spojený s minimálním promotorem. Takovýto konstrukt, když je zaveden do a exprimován v rostlině, může umožnit nízkou úroveň konstitutivní exprese polynukleotidu, což má za následek zesílenou systémovou obranu reakci rostliny. Minimální promotor obsahuje DNA sekvenční signály pro vazbu RNA polymerázy a iniciaci transkripce. Obecně, transkripce řízená minimálním promotorem je nízká a neodpovídá pozitivně ani negativně na okolní nebo vývojové signály v rostlinném pletivu. Příkladem minimálního promotoru, který je vhodný pro použití v rostlinách, je zkrácený promotor CaMV 35S, který obsahuje úsek od -90 do +8 z 35S transkripční jednotky.

Transkripční regulační sekvence mohou být použity pro řízení genové exprese v suspenzních kulturách. Například EAS4 promotor zahrnující signály pro iniciaci transkripce, indukovatelný úsek pro regulaci transkripce a transkripci zesilující úsek, může být použit pro zprostředkování indukovatelné exprese uvedené kódující sekvence v transgenních rostlinách nebo suspenzních buněčných kulturách. Viz U.S. Application Serial No. 08/577 483. Když je to požadováno, je exprese kódující sekvence zájmu indukována aplikací elicitoru nebo jiného indukujícího signálu.

Transgenní techniky, pro použití v tomto vynálezu, zahrnují také agrobakteriemi zprostředkovanou transformaci, elektroporaci a balistickou metodu transformace. Ilustrativní příklady transformačních technik jsou popsány v U. S. Patent 5 204 253 (balistická metoda) a U.S. Patent 5 188 958 (*Agrobacterium*). Transformační metody využívající Ti a Ri plazmidy agrobakterií spp. využívají obvykle podvojnými vektory. Walkerpeach C. et al., v Plant Molecular Biology Manual s., Gelvin a R. Schilperoort, ed., Kluwer Dordrecht, C1 : 1-19 (1994).

V některých provedeních může být indukovatelná transkripční regulační sekvence spojena s promotorovou sekvencí funkční v rostlinách, z nichž obě jsou operativně spojeny s polynukleotidem tohoto vynálezu. Když je takovýto regulační úsek spojen s promotorem, je obecně použit zkrácený (nebo minimální) promotor, např. zkrácený 35S promotor z viru mozaiky kvěťáku (CaMV). Použity mohou být také zkrácené verze jiných konstitutivních promotorů, např. genů T-DNA *A. tumefaciens* jako jsou nos, ocs a mas, a genů rostlinných virů jako je CaMV 19S gen.

V oboru jsou dobře známé techniky zavedení DNA do jednoděložných stejně jako dvouděložných rostlin, stejně jako techniky kultivace rostlinných pletiv a regenerace těchto pletiv. Mezi jednoděložné rostliny, které byly úspěšně transformovány a regenerovány, patří pšenici, kukuřici, žito, rýži a chřest. Viz. např. U. S. Patent No. 5 484 965 a 5 550 318. Byly připraveny transgenní pletiva osiky a byly regenerovány transgenní rostliny. Transformován byl také topol. Je také dosažitelná technologie pro manipulace, transformaci a regenerace krytosemenných rostlin. Viz. např. U. S. Patent No. 5 122 466 a U. S. Patent No. 5 041 382.

Způsob podle tohoto vynálezu zahrnuje zavedení konstruktů nukleové

kyseliny do rostlinné buňky a vytvoření transgenní rostliny z takovéto transformované buňky. Exprese polynukleotidu, přítomného v tomto konstruktu, změni fenotypické vyjádření rezistenci k nemocem v rostlině, např. v rostlině je vytvořeno nové fenotypické vyjádření rezistence k nemocem nebo je existující fenotypické vyjádření rezistence k nemocem zesíleno.

Fenotypické vyjádření rezistence k nemocem zahrnuje úroveň a načasování obranné reakce v transgenní rostlině. V pokusech, prováděných za účelem zjištění zda byla rezistence k nemocem změněna, se typicky na transgenní rostlinu aplikují sloučeniny, které běžně vyvolávají obrannou reakci, paralelně s aplikací stejných sloučenin na kontrolní rostlinu. Kontrolní rostlina je obvykle ze stejné rodičovské linie jako ta, do které byl zaveden nový konstrukt nukleové kyseliny. Rezistence k nemocem je v rostlině vytvořena nebo zesílena expresí polynukleotidu tohoto vynálezu, kdež je u transgenní rostliny vyšší stupeň rezistence než je odpovídající rezistence u kontrolní rostliny. Rezistence k nemocem může být měřena s ohledem na konkrétního patogena, např. *Phytophthora spp.* Rezistence k nemocem může být také měřena s ohledem na několik patogenů, za účelem zjištění zesílené systémové obranné reakce.

U transgenních rostlin, kde má být indukována exprese CDPK kódující sekvence operativně spojené s regulačním úsekem řízeným elicitorem, musí obvykle elicitor projít kutikulou rostliny, aby měl indukční účinek. Pro usnadnění nebo umožnění vniku elicitoru do rostlinného pletiva může být toto pletivo poraněno. Pro účinnou indukci exprese může být použita velká řada indukčních sloučenin, včetně elicitorů a jiných chemických signálních molekul, jako je kombinace ethylen- a methyjasmonátu.

Způsob použití polynukleotidu tohoto vynálezu zahrnuje hybridizaci

tohoto polynukleotidu s DNA nebo RNA nějaké rostliny. Hybridizace může být provedena např. tak, jak jest popsáno výše. Tento způsob dále zahrnuje kroky identifikace segmentu rostlinné DNA nebo RNA, který se vyznačuje významným stupněm sekvenční shody s tímto polynukleotidem, např. 70% sekvenční shodou, přednostně 80% sekvenční shodou, 90% sekvenční shodou nebo 95% sekvenční shodou. Tento segment může být identifikován pomocí elektroforetické separace rostlinné DNA nebo RNA a za použití značené polynukleotidové sondy, což má za následek vznik viditelného pruhu v pozici homologního segmentu. Segmenty mohou být vytvořeny např. mechanickou fragmentací nebo štěpením restriční endonukleázou. Segment může být krátký až 100 bp (nukleotidů), ale obvykle jsou segmenty dlouhé alespoň 1000 bp a mohou být dlouhé 10000 bp či více.

Takovýto způsob může dále zahrnovat kroky klonování alespoň části segmentu DNA nebo RNA, včetně, ale ne pouze, DNA ohraničující tento homologní segment. Takovéto ohraničující DNA mohou zahrnovat promotory, enhancery, transkripční regulační úseky a polyA sekvence. Ohraničující DNA může být buď na 5' nebo 3' straně od homologního segmentu a přednostně zahrnuje 300, 600 nebo 1000 bp za kódující sekvencí, protože regulační úseky se obecně nacházejí v tomto rozmezí.

Promotory a jiné regulační úseky citlivé k elicitoru nebo patogenu, ohraničující zde popsané nové polynukleotidy, jsou obzvláště užitečné, protože takovéto úseky umožňují velmi rychlou indukci genové exprese po působení patogenu nebo elicitoru. Takovéto regulační úseky mohou být operativně spojeny s užitečnými geny pro umožnění rychlé produkce požadovaných sloučenin. Např. takovéto regulační úseky mohou být použity pro řízení exprese genů kódující

protilátky, koagulační faktory, antigenní peptidy, virové replikázy nebo obalové proteiny, a enzymy zahrnuté v syntéze sekundárních metabolitů (jako např. biosyntéze izoprenoidů). Viz např. U. S. Patent 5 612 487; U. S. Patent 5 484 719 a U. S. Application Ser. No. 08/577483 vyplněná 22. prosince 1995.

Po zavedení chimerního genu, jehož součástí je regulační úsek citliví k elicitoru nebo patogenu, do rostliny, může být exprese chimerního genového produktu indukována příslušným patogenem nebo elicitorem. Rychle dojde k produkci požadovaného genového produktu (nebo jeho enzymatického koncového produktu) a může být získán požadovaný produkt.

Tento vynález bude dále popsán v následujících příkladech, které neomezují rozsah tohoto vynálezu popsany v nárocích.

Příklady provedení vynálezu

V následujících příkladech může být využíváno mnoho technik, které jsou dobře známé a přístupné odborníkům v oboru molekulární biologie, manipulací rekombinantní DNA v rostlinných pletivech a kultivace a regenerace transgenních rostlin. Enzymy byly získány z komerčních zdrojů a byly použity podle prodejcových pokynů nebo jejich v oboru známých obměn. Činidla, pufrů a kultivační podmínky jsou v oboru také známé. Zkratky a názvosloví, když jsou zde použity, jsou považovány za standardní v oboru a jsou běžně používány v profesionálních časopisech, jako jsou ty zde citované.

Příklad 1

Klonování tabákové CDPK cDNA

Elicitor parasiticein byl připraven expresí genu parA1 z druhu

Phytophthora v buňkách *E. coli* a izolací genového produktu z periplazmatického prostoru

Genomová DNA z *Phytophthora* kmen O byla izolována z mycelia v podstatě tak, jak je popsáno v Xu J. et al., Trends in Genetics 10 : 226-227 (1994). DNA byla rozdělena na fragmenty a byla použita jako templát pro PCR amplifikaci genu parA1 za použití primerů, které byly navrženy podle sekvence parA1, která byla publikována v Kamour s. et al., Mol. Plant-Microb Interact, 6 : 573-581 (1993). PCR produkt parA1 byl kolonován do pBluescriptu (Stratagene, San Diego, CA) a sekvence tohoto produktu byla získána sekvencováním dvouřetězcové DNA za použití metody využívající terminace řetězce dideoxynukleotidem.

ParA1 insert v pBluescriptu byl amplifikován pomocí PCR, za použití primerů, které vytvořily N-terminální histidinovou kotvu a proteinkinázové místo na 5' konci tohoto genu. PCR produkt byl ligován do expresního vektoru pET28b (Novagene, Medisone, WI) a po ověření DNA sekvence fúzovaného parA1 byly tímto pET28b konstruktem transformovány buňky *E. coli* BL21.

Kultura buněk BL21 obsahující fúzovaný parA1 rostla při 37 °C v přítomnosti kanamycinu do OD₆₀₀ = 0,3. Poté bylo přidáno IPTG (1mM) a kultura byla inkubována po dobu dalších 5 hodin při 27 °C.

Periplazmatické proteiny byly připraveny pomocí osmotického šoku v podstatě tak, jak jest popsáno v Ausubel F. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York (1989). Buňky (1,5 ml) byly sklizeny centrifugací, resuspendovány v 500 µl roztoku, který obsahoval 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 20% sacharose, 1mM EDTA, a byly inkubovány při třepání dalších 10 min při pokojové teplotě. Po centrifugaci byly pelety resuspendovány v 200 µl ledového MgSO₄

(5mM) a následovala inkubace při třepání po dobu 10 minut při 4 °C. Směs byla centrifugována a výsledný supernatant (obsahující periplazmatické proteiny) byl přenesen na Ni⁺⁺ kolonu. ParA1 protein byl na této koloně purifikován podle pokynů výrobce. Koncentrace proteinu v parA1 extraktu byla určena Bradfordovou metodou.

Na suspenzní kultury buněk *Nicotiana tabacum* L. cv. KY14 bylo během fáze rychlého růstu působeno parasiticeinem v konečné koncentraci 2 µl/ml za účelem indukce genů stresové reakce. Paralelní suspenzní buněčné kultury, na které nabylo působeno parasiticeinem, sloužily jako kontroly. Buňky byly shromážděny jemnou vakuovou filtrací 0, 30, 60 a 120 minut po přidání elicitoru.

Z tabákových buněk, na která bylo působeno elicitem i těch, na které nebylo působeno ničím, byla vyizolována totální RNA a byla použita jako templát pro TDDRT-PCR (targeted differential display reverse transcriptase PCR). První řetězec cDNA byl vytvořen za použití cDNA cycle soupravy od Invitrogen (San Diego, CA). První řetězce cDNA byly poté použity jako templáty pro PCR. PCR reakce byla provedena za typických podmínek, jak jsou popsány v PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications, Innis M., Gelfand D, Sminsky J. a White T., ed. Academic Press Inc., San Diego, CA, (1990), s výjimkou toho, že reasociační teplota byla 58 °C. PCR primery byly FokinB (GTTGACTCCCTACCCTCTT) a RecallV (GGTACTTAGGAAGTGTTACGGG). Viz obrázek 1. PCR produkty byly odděleny elektroforézou na 1% (w/v) agarózovém gelu a produkty, které byly větší než asi 800 párů bazí (bp) z kultury, na kterou bylo působeno po dobu 60 minut, byly purifikovány elektroelucí na DE-81 papír (Whatman). Konce purifikovaných PCR produktů byly doplněny Klenowovým fragmentem, ligovány do EcoRV místa pBluescriptu a transformovány do *E. coli*. TB1.

Ampicilin rezistentní TB1 kolonie byly testovány na přítomnost DNA fragmentu ≥ 800 bp, vloženého do pBluescriptu. Sekvence jednoho takového insertu byla určena metodou dideoxynukleotidové terminace podle Sanger et al., (1977) Proc. Ntl. Acad. Sci. USA 74 : 8073-8077, pomocí soupravy Sequenase® od United States Biochemical Corp., Cleveland, OH) nebo automatického na fluorescenci založeného systému (Applied Biosystems, Foster City, CA). Sekvence tohoto insertu ve vektoru byla určena na obou řetězcích. Plazmid obsahující tento insert byl označen jako pCDPK-1.

Nukleotidová sekvence tohoto insertu v plazmidu pCDPK-1 je ukázána na obrázku 2 a odvozená aminokyselinová sekvence tohoto insertu je ukázána na obrázku 3. Odvozená aminokyselinová sekvence byla srovnána s aminokyselinovými sekvencemi rostlinných genů v databázích GenBank, EMBL a Swiss Prot. Homologie byla nalezena s rostlinnými CDPK polypeptidy, včetně polypeptidů z *Glycine max*, *Arabidopsis thaliana*, *Vigna radiata*, *Zae mays* a *Cucurbita pepo*.

Za použití programu BLASTP a BLOSUM62 byly identifikovány dva úseky homologie se serin/treonin proteinkinázovými doménami v aminoterminální části polypeptidu a čtyři úseky homologie s Ca^{++} vazebnými doménami v karboxyterminální části polypeptidu. Obrázek 4 ukazuje srovnání aminokyselinové sekvence z obrázku 3 a CDPK aminokyselinové sekvence soji (Genbnak Accession No : M64987). Aminokyselinová sekvence tabákových vazebných míst vápníku byla podobná aminokyselinové sekvenci odpovídajících míst v CDPK soji. V ostatních částech sekvence byly však významné rozdíly. Srovnání ukazuje, že je existuje 78% celková shoda sekvence mezi CDPK soji s CDPK-1.

Program BLASTN byl použit pro srovnání nukleotidové sekvence pCDPK-1 s nukleotidovými sekvencemi v různých databázích. Na

základě nukleotidových sekvencí jiných CDPK genů a délky jimi kódovaných polypeptidů se má za to, že insert nukleové kyseliny přítomný v pCDPK-1 postrádá asi 560 bp na 5' konci CDPK-1 kódující sekvence a asi 130 bp na 3' konci CDPK-1 kódující sekvence.

Příklad 2

Izolace klonu cDNA plné délky

Pro získání klonu, který obsahuje cDNA plné délky, byla použita metoda RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) na templátu, kterým byla polyA⁺ RNA, připravená z tabákových buněk po indukci elicitorem. PolyA⁺ RNA byla připravena tak, jak jest popsáno v příkladě 1. Pro amplifikaci 3' konce CDPK kódující sekvence byl použit primer, mající sekvenci GAC AAG GAC GGG AGT GGG TAT (Primer A, uvnitř CDPK-1) a primer mající sekvenci GAC TCG AGT CGA CAT CGA TTT TTT TTT TTT TTT TT (dT₁₇ adapter-primer). Reverzní transkriptázová reakce byla provedena za použití 2 µl 10x RTC pufru, 10 jednotek RNasinu (Promega Biotech), 0,5 µg dT₁₇ adapter-primeru a 10 jednotek AMV reverzní transkriptázi (Life Science) v celkovém objemu 3,5 µl, jak jest popsáno ve Frohman M., PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications, supra, str. 28-38. PCR amplifikační reakce byla provedena za použití 5 µl 10x PCR pufru, 5 µl DMSO, 5 µl 10x dNTP (15 mM každý), 30 µl H₂O, 1 µl adapter-primeru (25 pmol, GAC TCG AGT CGA CAT CG), 1 µl primeru A a 1-5 µl cDNA. Časy cyklu byly takové, jak jest uvedena ve Froman, supra.

5' konec CDPK kódující sekvence byl klonován tak, že byla provedena reverzní transkripce, jak jest popsáno výše, za použití 10 pmol primeru B (AGG GGC TAC GTA GTA AGG ACT) místo d₁₇ adapter-primeru. cDNA produkt byl prodloužen pomocí terminální transferázy

a dATP, jak jest popsáno ve Frohman, supra, a poté byl amplifikován pomocí PCR, jak jest popsáno výše, s 10 pmol dT₁₇ adapter-primeru, 10 pmol adapter-primeru a 10 pmol primeru C (ATT CTC AGG CTT AAG GTC CCT). PCR byla provedeno za standardních podmínek. Beck et al., (1994), Arch. Biochem. Biophys. 315: 523-525. Amplifikované 3' a 5' konce byly na tupo klonovány do pBluecriptu SK (Stratagene) a byly spojeny s pCDPK-1 insertem pomocí běžných technik molekulární biologie za vzniku cDNA plné délky tabákové kódující sekvence. DNA sekvence cDNA plné délky byla určena pomocí metody terminace řetězce dideoxynukleotidem, jak jest popsáno v příkladu 1.

Příklad 3

Indukce CDPK-homologní RNA v tabákových suspenzních kulturách
DNA insert v pCDPK-1 byl použit jako sonda pro sledování indukce genové exprese v odpovědi na elicitor. Na suspenzní kultury buněk *Nicotiana tabacum* L. cv. KY14 bylo působeno parasiticeinem po dobu 0, 0,5, 1, 2, 6 a 12 hodin, jak je popsáno v příkladě 1. Byla izolována totální RNA a byla elektroforeticky rozdělena na 1% agarózovém gelu. Insert z pCDPK-1 byl radioaktivně označen pomocí metody náhodných primerů a nechal se hybridizovat s RNA rozdělenou na gelu, jak jest popsáno v Sambrook J. et al., supra. Před působením elicitoru nebyla detekována žádná mRNA, hybridizující s CDPK-1, zatímco mRNA, která s CDPK-1 hybridizovala, byla snadno detekována po působení elicitoru po dobu 0,5, 1 a 2 hodiny. Po 6 a 12 hodinovém působení elicitoru nebyla detekovatelná žádná mRNA hybridizující s CDPK-1, což naznačuje, že po asi 6 hodinách klesla exprese genu CDPK-1 na nedetekovatelné úrovni.

Příklad 4

Vytvoření chimerního CDPK genu

CDPK gen byl vytvořen z : chemicky syntetizované DNA kódující aminokyseliny 1 až 156 z CDPK genu ze soji z obrázku 6, chemicky syntetizované DNA kódující aminokyseliny 465 až 508 z CDPK genu ze soji z obrázku 6 a CDPK insertu z pCDPK-1. Tyto tři DNA byly ligovány pomocí běžných technik molekulární biologie za vzniku chimerní CDPK kódující sekvence, která měla aminokyseliny 1 až 156 z CDPK ze soji na aminotermiálním konci fúzované ve čtecím rámci s aminokyselinami 1 až 307 z tabákové CDPK (obr. 3), který byl dále fúzován ve čtecím rámci s aminokyselinami 465 až 508 z CDPK ze soji na karboxyterminálním konci.

Tato chimerní kódující sekvence byla v sense orientaci inserována do agrobakteriálního podvojného vektoru, obsahujícího minimální 35S a EAS4 indukovatelný regulační úsek. Operativní spojení tohoto regulačního úseku, promotoru a kódující sekvence bylo potvrzeno určením DNA sekvence spojovacích úseků a expresí v transgenních rostlinách.

Příklad 5

Příprava transgenních rostlin

Transformované rostlinná buněčná linie byla vytvořena za použití upraveného transformačního protokolu *pro Agrobacterium tumefaciens*. Byly připraveny konstrukty nukleových kyselin, obsahující CDPK cDNA plné délky z příkladu 3 nebo chimerní CDPK kódující sekvenci z příkladu 4. Rekombinatní konstrukty obsahující tyto sekvence, které měly být zavedeny do rostlin, byly přeneseny do kmenu *A. tumefaciens* GV3850 triparentálním spojením s *E.coli* TB1 (pRK2013). Listy *N. tabacum* v řadě stádií růstu byly nařezány na

části o ploše 1 cm^2 a byly ponořeny do suspenze buněk agrobakteria (asi 10^4 až 10^5 buněk na ml). Po 3 až 10 minutách byly části listů omyty ve sterilní vodě za účelem odstranění přebytečných bakteriálních buněk a zredukování problémů s růstem přebytečných bakterií na těchto částech listů. Po krátké době sušení (30 až 60 sekund) byly tyto části listů umístěny na povrch media Plant Tissue Culture Medium bez antibiotik, za účelem podpoření infekce pletiva a přenosu DNA z bakterie do rostlinné tkáně. Plant Tissue Culture Medium obsahuje na 1 litr : 4,31 g směsi Murashige and Skoog Basal Salts Mixture (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO), 2,5 g benzylaminopurinu (rozpuštěného v 1 N NaOH), 10 ml 0,1 mg/ml roztoku kyseliny indolactové, 30 g sacharosy, 2 ml roztoku Gamborg's Vitamin Solution (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) a 8 g agaru. Hodnota pH byla upravena na hodnotu mezi 5,5 a 5,9 pomocí NaOH. Po 2 dnech byly části listů přeneseny na Plant Tissue Culture Medium obsahující 300 $\mu\text{g/ml}$ kanamycinu, 500 $\mu\text{l/ml}$ mefoxinu (Merck, Rahway, NJ). Kanamycin selektuje transformovaná rostlinná pletiva a mefoxinu selektuje proti agrobakteriu.

Jestliže je použit patogenem indukovatelný regulační úsek, tak může být nutné minimalizování vystavení pletiva buňkám agrobakteria během transformace, protože buňky agrobakteria mohou po zavedení do rostlinných buněk sami tento úsek indukovat. Obdobně, balistická technika pro zavedení DNA obsahující sebevražedné geny pod regulační kontrolou indukovatelného transkripčního regulačního úseku je užitečnou alternativní transformační technikou, protože zde není nutné použití buněk agrobakteria či enzymů štepících buněčnou stěnu hub (jak je tomu při tvorbě protoplastů pro elektroporaci), což by mohlo vést k indukci kódující sekvence pod kontrolou tohoto regulačního úseku.

Transgenní rostliny byly vytvořeny v podstatě tak, jak jest popsáno v Horsch et al., (1985), Science 227 : 1229-1231.

Příklad 6

Elicitem a patogenem indukovatelná exprese chimerního CDPK genu v transgenním tabáku

Aktivity CDPK konstruktů z příkladu 7 jsou měřeny v transgenních rostlinách tabáku, na které je působeno buď elicitem nebo patogenem. Jako kontroly jsou také vytvořeny transgenní rostliny tabáku, které exprimují reportérový gen GUS pod kontrolou promotoru 35S z viru mozaiky kvěťáku (CaMV). F₁ semena z regenerovaných transgenních rostlin se nechala klíčit na médiu obsahujícím 100 mg/l kanamycinu. Výsledné kanamycin rezistentní rostliny byly následně přeneseny na půdu a nechaly se růst ve skleníku. Polovina rostlin byla testována na expresi CDPK genu za indukčních podmínek, např. při intracelulární aplikaci elicitoru nebo celulázy do transgenních rostlin. Elicitor nebo celulázy byly aplikovány mechanickou pipetou. Jako kontrola sloužily zbylé rostliny, na které bylo působeno roztokem postrádajícím celulázu nebo elicitor. Tabáková tkáň byla v některých pokusech poraněna skalpelem za účelem usnadnění vystavení indukční sloučenině.

Příklad 7

Identifikace CDPK homologních sekvencí

Genomová DNA z tabákových listů byla izolována tak, jak je popsáno v Murray a Thopson (1980), Nucleic Acids Research 8 : 4321-4325. Po štěpení alikvót požadovanými restrikcčními enzymy, byly vzorky naštěpené DNA elektroforeticky rozděleny na 0,8% agarózovém gelu. DNA rozdělené podle velikosti byly přeneseny na nylonové membrány.

DNA bloty byly hybridizovány s CDPK cDNA insertem velikosti 900 bp z příkladu 1, který byl radioaktivně označen pomocí metody náhodných primerů. Hybridizace byla provedena při 60 °C v pufru fosforečnanu sodného při pH 8,0, 0,7% SDS, 1% hovězím sérovém albuminu a 1mM EDTA. Blot byl poté dvakrát promyt při 45 °C 2X SSC, 0,1% SDS a dvakrát 0,2X SSC, 0,1% SDS (1X SSC je 0,15 M NaCl, 0,015 M citran sodný pH 7,0). Poměrné hybridizační intensity různých pruhů na membráně byly vypočteny z autoradiogramů za použití videodensitometru (MillGen/Bioreserch, Ann Arbor, MI).

Pro identifikaci polynukleotidů majících homologní sekvenci s tabákovou CDPK a zjištění zřejmého počtu kopií těchto sekvencí na genom byly provedeny Southernovy hybridizační pokusy za použití cílové DNA, izolované z jiných rostlinných druhů, a tabákových CDPK sond. Restrikčními endonukleázami štěpené genomové DNA různých rostlinných druhů byly rozděleny elektroforézou na agarózovém gelu (0,8% agaróze) a poté byly přeneseny na membránu Hybond-N⁺ (Amersham Corp., Arlington Heights, IL) Radioaktivně značené sondy, obsahující kódující sekvence pCDPK-1 byly hybridizovány se štěpenou genomovou DNA v podstatě tak, jak jest popsáno v Sombrook et al., (1989, supra. Byly použity málo přísné podmínky (hybridizace v 4X SSC, při 65 °C s promytím alespoň v 1X SSC při 65 °C).

Alternativou je provedení PCR za použití cílové DNA jako templátu a primerů, odvozených od vysoce konzervovaných úseků pCDPK-1 kódující sekvence.

Příklad 8

Genomová DNA ohraničující CDPK kódující sekvenci

cDNA klon popsáný v příkladě 1 byl použit jako hybridizační sonda

pro prohledávání genomové knihovny *N. tabacum* cv. NK326 ve vektoru λ EMBL3 (Clontech, Palo Alto, CA). Klony genomové DNA, které byly sekvenčně shodné s tabákovou CDPK z příkladu 1 ze 70 % nebo více byly identifikovány za použití rutinních subklonovacích postupů. Nukleotidové sekvence těchto klonovaných insertů nukleových kyselin byly zjištěny za použití rutinních metod sekvenování DNA.

Jeden z klonů genomové DNA měl kódující sekvenci plné délky, kterou obsahuje CDPK kódující sekvence z příkladu 1. Tento klon také obsahuje DNA sousedící na 5' s kódující sekvencí z příkladu 1. Testování nukleotidové sekvence této 5' ohraničující DNA v tomto klonu odhalilo údajný ATG kodon, stejně jako jeden nebo více údajných regulačních úseků upstream od tohoto start kodonu a do asi 1000 bp od tohoto start kodonu.

Jiná provedení

Rozumí se, že zatímco byl tento vynález popsán ve spojení s jeho detailním popisem, je předcházející popis považován za ilustrativní a neomezuje rozsah tohoto vynálezu, který je definován rozsahem přiložených nároků. Jiné podoby, výhody a modifikace jsou v rozsahu následujících nároků.

Přehled obrázků na výkresech.

Obrázek 1 představuje nukleotidovou sekvenci primerů FokinB a RecallV.

Obrázek 2 představuje DNA sekvenci (SEK.I. Č. : 1) klonu částečné cDNA, izolované ze suspenzní buněčné kultury odvozené od explantátu tabákového kultivaru KY14 po růstu v přítomnosti

elicitinu parasiteinu.

Obrázek 3 představuje vyvozenou aminokyselinovou sekvenci z DNA sekvence na obrázku 2 za použití standardního jednopísmenného aminokyselinového kódu.

Obrázek 4 je schématické porovnání aminokyselinová sekvence z obrázku 3 se sekvencí CDPK soji.

SEZNAM SEKVENCÍ

(1) OBECNÉ INFORMACE

(i) ŽADATEL : University of Kentucky Research Foundation

(ii) NÁZEV VYNÁLEZU : IZOLOVANÉ
POLYNUKLEOTIDY, JIMI KÓDOVANÉ PROTEINKINÁZY, JE
OBSAHUJÍCÍ KONSTRUKTY A TRANSGENNÍ ROSTLINY A
ZPŮSOB JEJICH POUŽITÍ.

(iii) POČET SEKVENCÍ : 11

(iv) ADRESA (SPOJENÍ)

(A) ADRESÁT : Fish & Richardson P. C., P. A.

(B) ULICE : 60 South Sixth Street, Suite 3300

(C) MĚSTO : Minneapolis

(D) STÁT : MN

(E) ZEMĚ : USA

(F) KÓD : 55402

(v) POČÍTAČEM ZPRACOVATELNÁ FORMA

(A) MEDIUM : Disketa

(B) POČÍTAČ : kompatibilní s IBM

(C) OPERAČNÍ SYSTÉM : DOS

(D) SOFTWARE : FastSEQ pro Windows verze 2.0

(vi) SOUČASNÁ DATA PŘIHLÁŠKY :

(A) ČÍSLO PŘIHLÁŠKY :

(B) DATUM VYPLNĚNÍ :

(C) KLASIFIKACE :

(vii) DŘÍVĚJŠÍ DATA PŘIHLÁŠKY :

(A) ČÍSLO PŘIHLÁŠKY : PCT/US98/14109

(B) DATUM VYPLNĚNÍ : 7.7. 98

(vii) DŘÍVĚJŠÍ DATA PŘIHLÁŠKY :

(A) ČÍSLO PŘIHLÁŠKY : O8/889 655

(B) DATUM VYPLNĚNÍ : 8.7. 98

(viii) INFORMACE O PRÁVNÍM ZÁSTUPCI/AGENTOVI :

(A) JMÉNO: Lundquist Roland C

(B) REGISTRAČNÍ ČÍSLO : 37 875

(C) ČÍSLO OSVĚDČENÍ : 07678/020CS1

(ix) TELEKOMUNIKAČNÍ INFORMACE :

(A) TELEFON : 612-335-5050

(B) TELEFAX : 612-288-9696

(C) TELEX :

(2) INFORMACE O SEK. I.Č. : 1

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE :

(A) DÉLKA : 921 párů bazí

(B) TYP : nukleová kyselina

(C) POČET ŘETĚZCŮ : dva

(D) TOPOLOGIE : lineární

(ii) TYP MOLEKULY : cDNA

(xi) POPIS SEKVENCE : SEK. I. Č. : 1

AGGGACCTTA AGCCTGAGAA TTTCTTTTC AGTGCCGACG ACTTCATGGT
 AAAGAGTAAG 60
 GCCACCGACT TCGGGCTTAG TGTATTCTAT AAGCCTGGGC AAAAGTTCAC
 GGACATAGTA 120
 GGGAGTCCTT ACTACGTAGC CCCTGAGGTA CTTAGGAAGT GTTACGGGCC
 TGGGAGTGAC 180
 GTATGGAGTG CCGGGGTAAT ACTTTACACC CTTCTTTGTG GGGCCCCTCC
 TTTCATGGCC 240
 GACAGTGAGC CTGGGGTAGC CTTCAAATA CTTTCATGGGG ACCTTGACTT
 CAAGAGTGAC 300
 CCTTGGCCTA CCATAAGTGA GAGTGCCAAG GACCTTATAA GGAAGATGCT
 TGAGCAAGAC 360
 CCTAAGAGGA GGCTTACCGC CCATGAGGTA CTTAGGCATC CTTGGATAGT
 AGACGAGAAT 420
 ATAGCCCCTG ACAAGCCTCT TGGGCCTGCC GTACTTAGTA GGCTTAAGCA
 ATTCAGTGCC 480
 ATGAATAAGA TAAAGAAGAT GGCCCTTAGG GTAATAGCCG AGAGGCTTAG
 TGAGGAGGAG 540
 ATAGTAGGGC TTAAGGAGAT GTTCAAGATG GACACCGACA ATAGTGGGAC
 CGTAACCTTC 600
 TTCCATCTTA AGCAAGGGCT TAAGAGGGTA GGGAGTCAAC TTGGGGAGAG
 TGAGATAAAG 660
 GACCTTATGG ACGCCGCCGA CGTAGACAAT AGTGGGACCA TAGACTATGG
 GGAGTTCGTA 720
 ACCGCCGCCA TGCATCTTAA TAAGATAAAG AGGGAGGACC ATCTTGTAAG
 TGCCTTCAGT 780
 TATCATGACA AGGACGGGAG TGGGTATATA GAGGTAGACG AGCTTAGGCA
 AGCCCTTGAG 840
 GAGTTCGGGG TACCTGACAC CAGTCTTGAG GACATGATAA AGGAGGTAGA
 CACCGACAAT 900
 GATGGGCAAA TAGATTATGG G
 921

(2) INFORMACE O SEK. I.Č. : 2

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE :

(A) DÉLKA : 307 aminokyselin

(B) TYP : aminokyselina

(D) TOPOLOGIE : lineární

(ii) TYP MOLEKULY : protein

(xi) POPIS SEKVENCE : SEK. I. Č. : 2

03.05.99

35

Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Phe Leu Phe Ser Ala Asp Asp Phe
 Met
 1 5 10 15
 Val Lys Ser Lys Ala Thr Asp Phe Gly Leu Ser Val Phe Tyr Lys
 Pro
 20 25 30
 Gly Gln Lys Phe Thr Asp Ile Val Gly Ser Pro Tyr Tyr Val Ala
 Pro
 35 40 45
 Glu Val Leu Arg Lys Cys Tyr Gly Pro Gly Ser Asp Val Trp Ser
 Ala
 50 55 60
 Gly Val Ile Leu Tyr Thr Leu Leu Cys Gly Ala Pro Pro Phe Met
 Ala
 65 70 75
 80
 Asp Ser Glu Pro Gly Val Ala Leu Gln Ile Leu His Gly Asp Leu
 Asp
 85 90 95
 Phe Lys Ser Asp Pro Trp Pro Thr Ile Ser Glu Ser Ala Lys Asp
 Leu
 100 105 110
 Ile Arg Lys Met Leu Glu Gln Asp Pro Lys Arg Arg Leu Thr Ala
 His
 115 120 125
 Glu Val Leu Arg His Pro Trp Ile Val Asp Glu Asn Ile Ala Pro
 Asp
 130 135 140
 Lys Pro Leu Gly Pro Ala Val Leu Ser Arg Leu Lys Gln Phe Ser
 Ala
 145 150 155
 160
 Met Asn Lys Ile Lys Lys Met Ala Leu Arg Val Ile Ala Glu Arg
 Leu
 165 170 175
 Ser Glu Glu Glu Ile Val Gly Leu Lys Glu Met Phe Lys Met Asp
 Thr
 180 185 190
 Asp Asn Ser Gly Thr Val Thr Phe Phe His Leu Lys Gln Gly Leu
 Lys
 195 200 205
 Arg Val Gly Ser Gln Leu Gly Glu Ser Glu Ile Lys Asp Leu Met
 Asp
 210 215 220
 Ala Ala Asp Val Asp Asn Ser Gly Thr Ile Asp Tyr Gly Glu Phe
 Val
 225 230 235
 240
 Thr Ala Ala Met His Leu Asn Lys Ile Lys Arg Glu Asp His Leu
 Val
 245 250 255
 Ser Ala Phe Ser Tyr His Asp Lys Asp Gly Ser Gly Tyr Ile Glu
 Val
 260 265 270
 Asp Glu Leu Arg Gln Ala Leu Glu Glu Phe Gly Val Pro Asp Thr
 Ser
 275 280 285
 Leu Glu Asp Met Ile Lys Glu Val Asp Thr Asp Asn Asp Gly Gln
 Ile
 290 295 300
 Asp Tyr Gly
 305

(2) INFORMACE O SEK. I.Č. : 3

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE :

- (A) DÉLKA : 22 párů bazí
- (B) TYP : nukleová kyselina
- (C) POČET ŘETĚZCŮ : jeden
- (D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) POPIS SEKVENCE : SEK. I. Č. : 3

GGTACTTAGG AAGTGTTACG GG

(2) INFORMACE O SEK. I.Č. : 4

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE :

- (A) DÉLKA : 19 párů bazí
- (B) TYP : nukleová kyselina
- (C) POČET ŘETĚZCŮ : jeden
- (D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) POPIS SEKVENCE : SEK. I. Č. : 4

GTTGACTCCC TACCCTCTT

(2) INFORMACE O SEK. I.Č. : 5

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE :

- (A) DÉLKA : 512 aminokyselin
- (B) TYP : aminokyselina

(D) TOPOLOGIE : lineární

(ii) TYP MOLEKULY : protein

(xi) POPIS SEKVENCE : SEK. I. Č. : 5

Thr Met Ala Ala Lys Ser Ser Ser Ser Ser Thr Thr Thr Asn Val Val
 1 5 10 15
 Leu Lys Ala Ala Trp Val Leu Pro Gln Arg Thr Gln Asn Ile Arg
 Glu
 20 25 30
 Val Tyr Glu Val Gly Arg Lys Leu Gly Gln Gly Gln Phe Gly Thr
 Thr
 35 40 45
 Phe Glu Cys Thr Arg Arg Ala Ser Gly Gly Lys Phe Ala Cys Lys
 Ser
 50 55 60
 Ile Pro Lys Arg Lys Leu Leu Cys Lys Glu Asp Tyr Glu Asp Val
 Trp
 65 70 75
 80
 Arg Glu Ile Gln Ile Met His His Leu Ser Glu His Ala Asn Val
 Val
 85 90 95
 Arg Ile Glu Gly Thr Tyr Glu Asp Ser Thr Ala Val His Leu Val
 Met
 100 105 110
 Glu Leu Cys Glu Gly Gly Glu Leu Phe Asp Arg Ile Val Gln Lys
 Gly
 115 120 125
 His Tyr Ser Glu Arg Gln Ala Ala Arg Leu Ile Lys Thr Ile Val
 Glu
 130 135 140
 Val Val Glu Ala Cys His Ser Leu Gly Val Met His Arg Asp Leu
 Lys
 145 150 155
 160
 Pro Glu Asn Phe Leu Phe Asp Thr Ile Asp Glu Asp Ala Lys Leu
 Lys
 165 170 175
 Ala Thr Asp Phe Gly Leu Ser Val Phe Tyr Lys Pro Gly Glu Ser
 Phe
 180 185 190
 Cys Asp Val Val Gly Ser Pro Tyr Tyr Val Ala Pro Glu Val Leu
 Arg
 195 200 205
 Lys Leu Tyr Gly Pro Glu Ser Asp Val Trp Ser Ala Gly Val Ile
 Leu
 210 215 220
 Tyr Ile Leu Leu Ser Gly Val Pro Pro Phe Trp Ala Glu Ser Glu
 Pro
 225 230 235
 240
 Gly Ile Phe Arg Gln Ile Leu Leu Gly Lys Leu Asp Phe His Ser
 Glu
 245 250 255
 Pro Trp Pro Ser Ile Ser Asp Ser Ala Lys Asp Leu Ile Arg Lys
 Met
 260 265 270

03.05.99

Leu Asp Gln Asn Pro Lys Thr Arg Leu Thr Ala His Glu Val Leu
 Arg
 275 280 285
 His Pro Trp Ile Val Asp Asp Asn Ile Ala Pro Asp Lys Pro Leu
 Asp
 290 295 300
 Ser Ala Val Leu Ser Arg Leu Lys Gln Phe Ser Ala Met Asn Lys
 Leu
 305 310 315
 320
 Lys Lys Met Ala Leu Arg Val Ile Ala Glu Arg Leu Ser Glu Glu
 Glu
 325 330 335
 Ile Gly Gly Leu Lys Glu Leu Phe Lys Met Ile Asp Thr Asp Asn
 Ser
 340 345 350
 Gly Thr Ile Thr Phe Asp Glu Leu Lys Asp Gly Leu Lys Asp Gly
 Leu
 355 360 365
 Lys Arg Val Gly Ser Glu Leu Met Glu Ser Glu Ile Lys Asp Leu
 Met
 370 375 380
 Asp Ala Ala Asp Ile Asp Lys Ser Gly Thr Ile Asp Tyr Gly Glu
 Phe
 385 390 395
 400
 Ile Ala Ala Thr Val His Leu Asn Lys Leu Glu Arg Glu Glu Asn
 Leu
 405 410 415
 Val Ser Ala Phe Ser Tyr Phe Asp Lys Asp Gly Ser Gly Tyr Ile
 Thr
 420 425 430
 Leu Asp Glu Ile Gln Gln Ala Cys Lys Asp Phe Gly Leu Asp Asp
 Ile
 435 440 445
 His Ile Asp Asp Met Ile Lys Glu Ile Asp Gln Asp Asn Asp Gly
 Gln
 450 455 460
 Ile Asp Tyr Gly Glu Phe Ala Ala Met Met Arg Lys Gly Asn Gly
 Gly
 465 470 475
 480
 Ile Gly Arg Arg Thr Met Arg Lys Thr Leu Asn Leu Arg Asp Ala
 Leu
 485 490 495
 Gly Leu Val Asp Asn Gly Ser Asn Gln Val Ile Glu Gly Tyr Phe
 Lys
 500 505 510

(2) INFORMACE O SEK. I.Č. : 6

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE :

(A) DÉLKA : 21 párů bazí

(B) TYP : nukleová kyselina

(C) POČET ŘETĚZCŮ : jeden

(D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) POPIS SEKVENCE : SEK. I. Č. : 6

GACAAGGACG GGAGTGGGTA T

(2) INFORMACE O SEK. I.Č. : 7

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE :

(A) DÉLKA : 35 párů bazí

(B) TYP : nukleová kyselina

(C) POČET ŘETĚZCŮ : jeden

(D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) POPIS SEKVENCE : SEK. I. Č. : 7

GACTCGAGTC GACATCGATT TTTTTTTTTT TTTT

(2) INFORMACE O SEK. I.Č. : 8

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE :

(A) DÉLKA : 17 párů bazí

(B) TYP : nukleová kyselina

(C) POČET ŘETĚZCŮ : jeden

(D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) POPIS SEKVENCE : SEK. I. Č. : 8

GACTCGAGTA GACATCG

(2) INFORMACE O SEK. I.Č. : 9

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE :

(A) DÉLKA : 21 párů bazí

(B) TYP : nukleová kyselina

(C) POČET ŘETĚZCŮ : jeden

(D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) POPIS SEKVENCE : SEK. I. Č. : 9

AGGGGCTACG TAGTAAGGAC T

(2) INFORMACE O SEK. I.Č. : 10

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE :

(A) DÉLKA : 21 párů bazí

(B) TYP : nukleová kyselina

(C) POČET ŘETĚZCŮ : jeden

(D) TOPOLOGIE : lineární

(xi) POPIS SEKVENCE : SEK. I. Č. : 10

ATTCTCAGGC TTAAGGTCCC T

(2) INFORMACE O SEK. I.Č. : 11

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCE :

(A) DÉLKA : 308 aminokyselin

(B) TYP : aminokyselina

(D) TOPOLOGIE : lineární

(ii) TYP MOLEKULY : protein

(xi) POPIS SEKVENCE : SEK. I. Č. : 11

03.05.99

Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Phe Leu Phe Ser Ala Asp Asp Phe
 Met
 1 5 10 15
 Val Lys Ser Lys Ala Thr Asp Phe Gly Leu Ser Val Phe Tyr Lys
 Pro
 20 25 30
 Gly Gln Lys Phe Thr Asp Ile Val Gly Ser Pro Tyr Tyr Val Ala
 Pro
 35 40 45
 Glu Val Leu Arg Lys Cys Tyr Gly Pro Gly Ser Asp Val Trp Ser
 Ala
 50 55 60
 Gly Val Ile Leu Tyr Thr Leu Leu Cys Gly Ala Pro Pro Phe Met
 Ala
 65 70 75
 80
 Asp Ser Glu Pro Gly Val Ala Leu Gln Ile Leu His Gly Asp Leu
 Asp
 85 90 95
 Phe Lys Ser Asp Pro Trp Pro Thr Ile Ser Glu Ser Ala Lys Asp
 Leu
 100 105 110
 Ile Arg Lys Met Leu Glu Gln Asp Pro Lys Arg Arg Leu Thr Ala
 His
 115 120 125
 Glu Val Leu Arg His Pro Trp Ile Val Asp Glu Asn Ile Ala Pro
 Asp
 130 135 140
 Lys Pro Leu Gly Pro Ala Val Leu Ser Arg Leu Lys Gln Phe Ser
 Ala
 145 150 155
 160
 Met Asn Lys Ile Lys Lys Met Ala Leu Arg Val Ile Ala Glu Arg
 Leu
 165 170 175
 Ser Glu Glu Glu Ile Val Gly Leu Lys Glu Met Phe Lys Met Ile
 Asp
 180 185 190
 Thr Asp Asn Ser Gly Thr Val Thr Phe Phe His Leu Lys Asp Gly
 Leu
 195 200 205
 Lys Arg Val Gly Ser Gln Leu Gly Glu Ser Glu Ile Lys Asp Leu
 Met
 210 215 220
 Asp Ala Ala Asp Val Asp Asn Ser Gly Thr Ile Asp Tyr Gly Glu
 Phe
 225 230 235
 240
 Val Thr Ala Ala Met His Leu Asn Lys Ile Lys Arg Glu Asp His
 Leu
 245 250 255
 Val Ser Ala Phe Ser Tyr His Asp Lys Asp Gly Ser Gly Tyr Ile
 Glu
 260 265 270
 Val Asp Glu Ile Arg Gln Ala Leu Glu Glu Phe Gly Val Pro Asp
 Thr
 275 280 285
 Ser Leu Glu Asp Met Ile Lys Glu Val Asp Thr Asp Asn Asp Gly
 Gln
 290 295 300
 Ile Asp Tyr Gly
 305

P A T E N T O V É N Á R O K Y

~~32297~~

1. Izolovaný polynukleotid, kde tento polynukleotid zahrnuje :
 - a) nukleotidovou sekvenci SEK.I. Č. : 1;
 - b) RNA analog SEK.I. Č. : 1;
 - c) polynukleotid obsahující sekvenci nukleové kyseliny, která je komplementární k a) nebo b) nebo ;
 - d) fragment nukleové kyseliny z a), b) nebo c), který je dlouhý alespoň 20 nukleotidů a který za přísných podmínek hybridizuje s genomovou DNA kódující polypeptid z obrázku 3.
2. Polynukleotid nároku 1, kde tento polynukleotid obsahuje nukleotidy 1 až 170 z obrázku 2.
3. Polynukleotid nároku 1, kde tento polynukleotid obsahuje nukleotidy 160 až 560 z obrázku 2.
4. Polynukleotid nároku 1, kde tento polynukleotid obsahuje nukleotidy 550 až 920 z obrázku 2.
5. Konstrukt nukleové kyseliny obsahující polynukleotid nároku 1.
6. Konstrukt nukleové kyseliny nároku 5, který dále obsahuje regulační úsek operativně spojený se zmíněným polynukleotidem.
7. Konstrukt nukleové kyseliny nároku 6, kde je zmíněný regulační úsek indukovatelný regulační úsek.
8. Konstrukt nukleové kyseliny nároku 7, kde je zmíněný regulační

úsek indukovaný v reakci na rostlinného patogena.

9. Transgenní rostlina, obsahující konstrukt nukleové kyseliny obsahující polynukleotid nároku 1.

10. Rostlina nároku 9, kde zmíněný konstrukt dále obsahuje regulační úsek operativně spojený se zmíněným polynukleotidem.

11. Rostlina nároku 10, kde je zmíněný regulační úsek indukovatelný regulační úsek.

12. Rostlina nároku 11, kde je zmíněný regulační úsek indukovaný v reakci na rostlinného patogena.

13. Rostlina nároku 12, kde je zmíněný regulační úsek indukovaný v reakci na elicitor.

14. Rostlina nároku 9, kde je tato rostlina dvouděložnou rostlinou.

15. Rostlina nároku 14, kde tato rostlina patří do čeledi *Solanaceae*.

16. Rostlina nároku 15, kde tato rostlina je tabáková rostlina.

17. Rostlina nároku 16, kde tato rostlina je *Nicotiana tabacum*.

18. Transgenní rostlina, která obsahuje polynukleotid exprimující polypeptid, který má od asi 250 do asi 550 aminokyselin, kde zmíněný polypeptid obsahuje aminokyselinovou sekvenci, která je v podstatě identická s aminokyselinovou sekvencí z obrázku 3.

19. Rostlina nároku 18, kde zmíněný polypeptid obsahuje aminokyselinovou sekvenci z obrázku 3.
20. Rostlina nároku 19, kde je tato rostlina dvouděložnou rostlinou.
21. Rostlina nároku 20, kde tato rostlina patří do čeledi *Solanaceae*.
22. Způsob použití polynukleotidu, kde tento způsob zahrnuje krok hybridizace polynukleotidu nároku 1 s DNA nebo RNA z nějaké rostliny.
23. Způsob nároku 22, který dále zahrnuje krok indentifikace segmentu zmíněné rostlinné DNA nebo RNA, který se vyznačuje asi 70% nebo vyšší sekvenční shodou se zmíněným polynukleotidem.
24. Způsob nároku 23, který dále zahrnuje krok klonování alespoň části zmíněného DNA nebo RNA segmentu.
25. Způsob nároku 24, kde zmíněná klonovaná část dále obsahuje DNA ohraničující zmíněný segment, který se vyznačuje asi 70% nebo vyšší sekvenční shodou.
26. Způsob změny rezistence k nemocem u rostliny, kde tento způsob zahrnuje kroky :
- (a) zavedení konstruktu nukleové kyseliny nároku 5 do rostlinné buňky; a (b) vytvoření rostliny, která obsahuje zmíněný polynukleotid, ze zmíněné buňky, kde exprese zmíněného polynukleotidu mění rezistenci k nemocem u dané rostliny.

27. Způsob nároku 26, kde zmíněný konstrukt nukleové kyseliny dále obsahuje indukovatelný regulační úsek, operativně spojený se zmíněným polynukleotidem a zmíněná exprese je regulována zmíněným regulačním úsekem.

28. Způsob nároku 27, kde je zmíněná exprese indukována pomocí zmíněného regulačního úseku při vystavení zmíněné rostliny elicitoru nebo rostlinnému patogenu.

29. Izolovaný polypeptid, který má od asi 250 do asi 550 aminokyselin, kde zmíněný polypeptid obsahuje aminokyselinovou sekvenci, která je v podstatě identická s obrázkem 3.

30. Polypeptid nároku 29, kde zmíněný polypeptid obsahuje aminokyselinovou sekvenci z obrázku 3.

OBRÁZEK 1

PRIMERY

RecalV - 1 = GTTGACTCCCTACCCCTCTT



1/5

VAZEBNÉ MÍSTO PRO VÁPNÍK

FokinB - 1 = GGTACTTAGGAAGTGTTACGGG



KINÁZOVÁ DIAGNOSTICKÁ SEKVENCE

03.05.99

PV 698-99

~~32297~~

1

03.05.99

3/5

AAG ATG GCC CTT AGG GTA ATA GCC GAG AGG CTT AGT GAG GAG GAG
TTC TAC CGG GAA TCC CAT TAT CGG CTC TCC GAA TCA CTC CTC CTC

550

560

570

580

ATA GTA GGG CTT AAG GAG ATG TTC AAG ATG GAC ACC GAC AAT AGT
TAT CAT CCC GAA TTC CTC TAC AAG TTC TAC CTG TGG CTG TTA TCA

590

600

610

620

630

GGG ACC GTA ACC TTC TTC CAT CTT AAG CAA GGG CTT AAG AGG GTA
CCC TGG CAT TGG AAG AAG GTA GAA TTC GTT CCC GAA TTC TCC CAT

640

650

660

670

GGG AGT CAA CTT GGG GAG AGT GAG ATA AAG GAC CTT ATG GAC GCC
CCC TCA GTT GAA CCC CTC TCA CTC TAT TTC CTG GAA TAC CTG CGG

680

690

700

710

720

GCC GAC GTA GAC AAT AGT GGG ACC ATA GAC TAT GGG GAG TTC GTA
CGG CTG CAT CTG TTA TCA CCC TGG TAT CTG ATA CCC CTC AAG CAT

730

740

750

760

ACC GCC GCC ATG CAT CTT AAT AAG ATA AAG AGG GAG GAC CAT CTT
TGG CGG CGG TAC GTA GAA TTA TTC TAT TTC TCC CTC CTG GTA GAA

770

780

790

800

810

GTA AGT GCC TTC AGT TAT CAT GAC AAG GAC GGG AGT GGG TAT ATA
CAT TCA CGG AAG TCA ATA GTA CTG TTC CTG CCC TCA CCC ATA TAT

820

830

840

850

GAG GTA GAC GAG CTT AGG CAA GCC CTT GAG GAG TTC GGG GTA CCT
CTC CAT CTG CTC GAA TCC GTT CGG GAA CTC CTC AAG CCC CAT GGA

860

870

880

890

900

GAC ACC AGT CTT GAG GAC ATG ATA AAG GAG GTA GAC ACC GAC AAT
CTG TGG TCA GAA CTC CTG TAC TAT TTC CTC CAT CTG TGG CTG TTA

910

920

GAT GGG CAA ATA GAT TAT GGG
CTA CCC GTT TAT CTA ATA CCC

OBRÁZEK 2B

03.05.99

4/5

10	20	30	40
*	*	*	*
ADL KZE NEL FSA DDE MVK SKA TDF GLS VFY KPG QKE TDI VGS PYY			
50	60	70	80
*	*	*	*
VAP EVL RKC YGP GSD VWS AGV ILY TLL CGA PPF MAD SEP GVA LQI			
100	110	120	130
*	*	*	*
LHG DLD FKS DPW PTI SES AKO LIR KML EQD PKR RLT AHE VLR HPW			
140	150	160	170
*	*	*	*
IVD ENI APD KPL GPR VLS RLK QFS AMN KIK KMA LRV IAE RLS EEE			
190	200	210	220
*	*	*	*
IVG LKE MEK MDT DNS GTV TFF HLK QGL KRV GSQ LGE SEI KDL MDA			
230	240	250	260
*	*	*	*
ADV DNS GTI DYG EFV TAA MHL NKI KRE DHL VSA FSY HDK DGS GYI			
280	290	300	
*	*	*	
EVD ELR QAL EEF GVP DTS LED MIK EVD TDN DGQ IDY G			

OBRÁZEK 3

OBRÁZEK 4

5/5

HAAKSSSSITTNUTLKAAWLPQRTQINREUYEUGAKLGGQFGTTECTRASGGKF

NCKSIPKAKLLCKEDYEDUWREIQIMHHLSEHANUURIEGTVEDSTAUHLUMELCEGGEI

FDRIUQKGHVSEINQAARLIKTIUEUUEACHSLGUMHRDLKPEMFLFDITIDEDAKLKATDF
SAD.FMU.S.....

GLSUFVKPGESFCDDUGSPYVVAPEULAKLVGPESDUWSAGUILYILLSGUPFFWAESEP
QK.T.I.....C.G.....T.C.A...M.D....

GIFRQILLGKLDHFHSEWPSISDSAKDLIRKMLDQNPKTRLTAEULRHPWIUDDMIAPD
 .UAL...H.D...K.D...T.E...E.D..R.....E.....

KPLDSAULSRLKQFSAMKLLKKAALRAVIAERLSEEEIGGLKELFKMIDTDSNGTITFDEL
 ...GP.....I.....U...M...U...FH.....

KDGLKRUUGSELMESEIKDLMDAADIDKSGTIDYGEFIAATUHLNKLEREENLUSAFSYFD
Q.G.....U.N.....UT.AM...IK...DH.....H.

KDGSYVITLDEIQQACKDFGLDDIHDDMIKEIQDNDGQIDYGEFAAMHAKGNGGIGRR
EU...R...LEE..UP.TSLE.....U.T.....

THAKTLNLRDNLGLUDNGSNQUIEGYFX

PRIMERY

PROTEINKINÁZOVÉ SEKVENCE

VAZEBNÁ MÍSTA PRO VÁPNIK

03.03.99