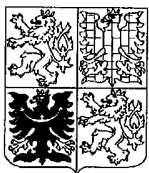


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 02.03.1998

(32) Datum podání prioritní přihlášky: 04.03.1997

(31) Číslo prioritní přihlášky: 1997/19708774

(33) Země priority: DE

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 12.01.2000
(Věstník č. 1/2000)

(86) PCT číslo: PCT/EP98/01156

(87) PCT číslo zveřejnění: WO98/39460

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 3140

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/82

C 12 N 9/10

C 12 Q 1/68

C 12 P 19/04

A 01 H 5/00

(71) Přihlašovatel:

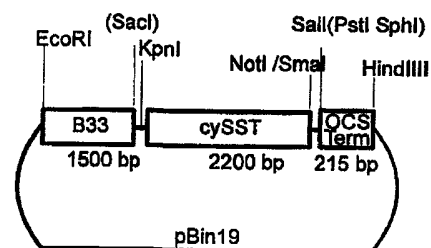
MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E. V.,
Berlin, DE;

(72) Původce:

Heyer Arnd G., Berlin, DE;
Hellwege Elke, Berlin, DE;
Gritscher Dominique, Berlin, DE;

(74) Zástupce:

Všetečka Miloš JUDr., Hálkova 2, Praha 2,
120 00;



(54) Název přihlášky vynálezu:

**Molekuly nukleové kyseliny kódující enzymy,
které mají fruktosylpolymerázovou aktivitu, a
vektory, hostitelské buňky a transgenní
rostliny obsahující tyto nukleové kyseliny**

(57) Anotace:

Jsou popsány molekuly nukleové kyseliny kódující enzymy mající fruktosylpolymerázovou aktivitu. Tyto enzymy jsou sacharózofruktosyltransferázy závislé na sacharóze /SST/. Dále jsou popsány vektory a hostitelské buňky obsahující molekuly nukleové kyseliny, zejména transformované rostlinné buňky a rostliny, které z nich mohou být regenerovány a které exprimují popsané SST. Kromě toho jsou popsány způsoby produkce fruktosylových polymerů s krátkým řetězcem použití popsaných hostitelů a/nebo jimi tvořené SST.

23.09.99

PV 2140-99

679/10

1

Molekuly nukleové kyseliny kódující enzymy, které mají fruktosylpolymerázovou aktivitu, a vektory, hostitelské buňky a transgenní rostliny obsahující tyto nukleové kyseliny

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká molekul nukleové kyseliny kódujících sacharózofruktosyltransferázy závislé na sacharóze (SST). Dále se tento vynález týká vektorů a hostitelů obsahujících takové molekuly nukleové kyseliny, jakož i rostlinných buněk a rostlin transformovaných popsányi molekulami nukleové kyseliny. Kromě toho jsou popsány způsoby produkce transgenních rostlin, které syntetizují fruktosylové polymery s krátkým řetězcem díky zavedení molekul DNA kódujícím SST z artyčoku. Předkládaný vynález se také týká způsobů přípravy SST pro produkci fruktosylových polymerů s krátkým řetězcem v různých hostitelských organismech, a také SST, s jejíž pomocí mohou být tvořeny fruktosylové polymery s krátkým řetězcem použitím různých metod, například fermentačních nebo jiných biotechnologických metod.

Dosavadní stav techniky

Lineární, ve vodě rozpustné polymery mají mnohé různé možnosti použití, například pro zvýšení viskozity vodných systémů, jako detergenty, jako suspenzační činidla nebo pro urychlení sedimentačního procesu a pro komplexování, ale také pro vázání vody. Polymery na bázi sacharidů, například fruktosylové polysacharidy, jsou obzvláště zajímavé materiály, protože jsou biologicky odbouratelné.

Nezávisle na jejich použití jako regenerační suroviny pro průmyslovou produkci a zpracování, jsou fruktosylové polymery také zajímavé jako

potravní aditiva, například jako umělá sladidla. Pro tento účel jsou obzvláště vhodné polymery mající nízký stupeň polymerizace.

Doposud byly popsány pouze způsoby produkce fruktanových polysacharidů s dlouhým řetězcem v rostlinách expresí enzymů bakteriálního původu, jakož i způsob produkce transgenních rostlin exprimujících fruktosyltransferázy z *Helianthus tuberosus*. Způsoby tvorby enzymů pro produkci fruktosylových polymerů s krátkým řetězcem nejsou známy. V popisu patentové přihlášky PCT/USA89/02729 se popisuje možnost tvořit cukerné polymery, zejména dextran nebo polyfruktózu, v transgenních rostlinách, obzvláště v plodech transgenních rostlin. Pro přípravu takových modifikovaných rostlin se navrhuje použití levansacharózy z mikroorganismů, konkrétně z *Aerobacter levanicum*, *Streptococcus salivarius* a *Bacillus subtilis*, nebo dextransacharózy z *Leuconostoc mesenteroides*. Nepopisuje se ani produkce aktivních enzymů ani levanu či dextranu ani transgenních rostlin. patentová přihláška PCT/EP93/02110 popisuje způsob produkce transgenních rostlin exprimujících gen Isc levansacharózy z gram-negativní bakterie *Erwinia amylovora*. V patentové přihlášce PCT/NL93/00279 je popsána transformace rostlin majících chimérické geny, které obsahují gen sacB z *Bacillus subtilis* nebo gen ftf ze *Streptococcus mutans*. V případě genu sacB se doporučuje pro zvýšení hladiny exprese v transgenních rostlinách modifikace v 5'-netranslatované oblasti genu. Patentová přihláška PCT/NL96/00012 popisuje sekvence DNA kódující enzymy syntetizující cukerné polymery a produkci transgenních rostlin s pomocí těchto sekvencí DNA. Popisované sekvence pocházejí z *Helianthus tuberosus*. Podle dokumentu PCT/NL96/00012 jsou popsány sekvence vhodné nejenom k modifikaci fruktanového profilu například petúnie a brambory, ale také samotné *Helianthus tuberosus*. Proto přihláška PCT/NL96/00012 popisuje, kromě jiného, transgenní brambory exprimující SST z *Helianthus tuberosus*. Dokonce i když lze detekovat enzymatickou aktivitu SST exprimované

v transgenních rostlinách, může být dosaženo pouze nízké úrovně konverze substrátu sacharózy na fruktosylové polymery s krátkým řetězcem. To může mít vztah k různým faktorům, jako je nízká afinita enzymu k substrátu nebo případná inhibice enzymu tvořeným produktem.

Proto je předmětem předkládaného vynálezu poskytnout molekuly nukleové kyseliny kódující sacharózofruktosyltransferázu závislou na sacharóze (SST), s jejíž pomocí je možné připravit organismy modifikované metodami genetického inženýrství tak, že jsou schopné produkovat fruktosylové polymery s krátkým řetězcem.

Výše zmíněný problém je řešen předkládaným vynálezem, který je popsán pomocí následujících příkladů a definován patentovými nároky.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález se týká molekul nukleové kyseliny kódujících proteiny, které mají biologickou aktivitu SST a jsou vybrány ze skupiny obsahující

a) molekuly nukleové kyseliny kódující protein, který obsahuje aminokyselinovou sekvenci zobrazenou zde v sekvenci id. č. 2 a v sekvenci id. č. 4,

b) molekuly nukleové kyseliny obsahující nukleotidovou sekvenci zobrazenou v sekvenci id. č. 1 nebo odpovídající ribonukleotidovou sekvenci,

c) molekuly nukleové kyseliny obsahující nukleotidovou sekvenci zobrazenou v sekvenci id. č. 3 nebo odpovídající ribonukleotidovou sekvenci,

d) molekuly nukleové kyseliny hybridizující s molekulami nukleové kyseliny uvedenými v a) nebo b) a kódujícími SST, jejíž aminokyseliny jsou alespoň z 90 % identické s aminokyselinovou sekvencí zobrazenou v sekvenci id. č. 2, a

e) molekuly nukleové kyseliny, jejichž nukleotidová sekvence se odchyluje od sekvence uvedené v a), b) nebo c) díky degeneraci genetického kódu.

Ve smyslu předkládaného vynálezu se rozumí, že enzym mající fruktosylpolymerázovou aktivitu je protein, který je schopný katalyzovat vznik β -2,1-glykosidické nebo β -2,6-glykosidické vazby mezi fruktózovými jednotkami. Fruktosylový zbytek, který má být přenesen, může takto pocházet ze sacharózy nebo fruktanového polymeru.

Fruktosylovým polymerem s krátkým řetězcem se rozumí molekula obsahující alespoň dva, ale ne více než 100 fruktosylových zbytků, které jsou spojeny buď β -2,1- nebo β -2,6-glykosidickou vazbou. Fruktosylový polymer může nést na svém konci glukózový zbytek, který je spojen prostřednictvím OH skupiny na atomu C-1 glukózy a OH skupiny atomu C-2 fruktosylu. V tomto případě fruktosylový polymer obsahuje molekulu sacharózy.

Ve výhodném provedení pocházejí sekvence nukleové kyseliny vynálezu z artyčoku.

Překvapivě bylo zjištěno, že během exprese molekul nukleové kyseliny podle vynálezu se tvořila velká množství fruktosylových polymerů.

Když jsou použity molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu, získá se na rozdíl od brambor popsaných v patentové přihlášce PCT/NL96/00012 velké množství oligofruktanu, které je dokonce větší, než buněčný obsah substrátové sacharózy.

Molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu mohou být jak DNA, tak RNA molekuly. Vhodné molekuly DNA jsou například molekuly genomové DNA nebo cDNA. Molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu mohou být izolovány z přírodních zdrojů, výhodně artyčoku, nebo mohou být syntetizovány pomocí známých metod.

Prostřednictvím obvyklých molekulárně biologických metod je možné (viz např. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)

zavést do molekul nukleové kyseliny vynálezu odlišné mutace. Výsledkem je, že takto je možné syntetizovat proteiny s modifikovanými biologickými vlastnostmi. Jedna možnost je tvorba delečních mutant, ve kterých se tvoří molekuly nukleové kyseliny neustálými delecemi od 5'- nebo 3'-konce kódující sekvence DNA, a to vede k syntéze proteinů, které jsou adekvátně zkráceny. Takovými delecemi na 5'-konci nukleotidové sekvence je například možné identifikovat aminokyselinové sekvence, které jsou odpovědné za translokaci enzymu v plastidech (transiční peptidy). To umožňuje specifickou produkci enzymů, které díky odstranění příslušných sekvencí nejsou již dále lokalizovány ve vakuolách, ale v cytosolu, nebo které jsou díky přidání dalších signálních sekvencí lokalizovány v jiných kompartmentech.

Další možností je zavedení bodové mutace na pozice, kde modifikace aminokyselinové sekvence ovlivňuje např. enzymovou aktivitu nebo regulaci enzymu. Tímto způsobem mohou být například tvořeny mutanty, které mají změněnou hodnotu K_m nebo které již nadále nepodléhají regulačním mechanismům, které normálně v buňce existuje vzhledem k alosterické regulaci nebo kovalentní modifikaci.

Kromě toho mohou být tvořeny mutanty, které vykazují změněnou specifitu pro substrát nebo produkt. Mohou být také tvořeny mutanty, které vykazují změněný profil aktivita-teplota.

Pro manipulaci v prokaryotických buňkách pomocí metod genetického inženýrství mohou být molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu nebo části těchto molekul zavedeny do plazmidů umožňujících mutagenezi nebo modifikaci sekvence rekombinací sekvence DNA. Prostřednictvím obvyklých metod (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) se mohou vyměňovat báze a mohou být přidány přirozené nebo syntetické sekvence. Aby se fragmenty DNA navzájem spojily, mohou k nim být přidány adaptéry nebo spojky (linkery). Mimoto se mohou provádět manipulace, které poskytují vhodná štěpná místa nebo které odstraňují přebytečnou DNA

nebo štěpná místa. Jsou-li možné inserce, delece nebo substituce, může se provádět *in vitro* mutageneze, náhrada pomocí primeru, restrikce nebo ligace. Jako metody analýzy se obvykle používají sekvenční analýza, restrikční analýza a další biochemické nebo molekulárně biologické metody.

Termín „hybridizace“ má ve smyslu tohoto vynálezu význam hybridizace za obvyklých hybridizačních podmínek, výhodně za stringentních podmínek, jak je například popsáno v Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2. vydání, (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Molekuly nukleové kyseliny, které hybridizují s molekulami podle vynálezu, mohou být izolovány např. z genomových nebo cDNA knihoven, které byly připraveny z artyčoku.

Aby se identifikovaly a izolovaly takové molekuly nukleové kyseliny, mohou být použity molekuly vynálezu nebo části těchto molekul nebo reverzní komplementy těchto molekul, například prostřednictvím hybridizace podle obvyklých metod (viz např. Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Jako hybridizační sonda mohou být například použity molekuly nukleové kyseliny, jejichž nukleotidová sekvence je zcela shodná nebo podstatně podobná sekvenci zobrazené zde jako sekvence id. č. 1, nebo části těchto sekvencí. Fragmenty použité jako hybridizační sonda mohou být syntetické fragmenty, které byly vytvořeny prostřednictvím obvyklých způsobů syntézy, a jejichž sekvence v podstatě souhlasí se sekvencí molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu.

Molekuly hybridizující s molekulami nukleové kyseliny podle vynálezu také zahrnují fragmenty, deriváty a alelické varianty molekul nukleové kyseliny popsaných výše kódujících protein podle vynálezu. Termínem „fragmenty“ se rozumí části molekul nukleové kyseliny, které jsou dostatečně dlouhé, aby kódovaly jeden z popisovaných proteinů. Termín „derivát“

v tomto smyslu znamená, že se sekvence těchto molekul liší od sekvencí molekul nukleové kyseliny popsanych výše v jedné nebo několika pozicích, ale s těmito sekvencemi mají vysoký stupeň homologie. Homologie takto znamená sekvence identické alespoň ve 40 %, zejména identické alespoň v 60 %, výhodně ve více než 80 % a zejména výhodně ve více než 90 %. Tyto proteiny kódované molekulami nukleové kyseliny mají sekvenci identickou s aminokyselinovou sekvencí zobrazenou v sekvenci id. č. 2 alespoň v 80 %, výhodně v 85 % a zejména výhodně ve více než 90 %, 95 %, 97 % a 99 %. Odchytky od výše popsanych molekul nukleové kyseliny mohou být tvořeny delecí, substitucí, inzercí nebo rekombinací.

Molekuly nukleové kyseliny, které jsou homologní s výše popsanyými molekulami a které představují deriváty těchto molekul jsou obvykle varianty těchto molekul, které představují modifikace mající tutéž biologickou funkci. Mohou to být přirozeně se vyskytující varianty, například sekvence z jiných organismů nebo mutace, které mohou nastat buď přirozeně nebo které byly vneseny specifickou mutagenezí. Kromě toho mohou být tyto varianty synteticky vytvořené sekvence. Alelické varianty mohou být buď přirozeně se vyskytující varianty nebo synteticky vytvořené varianty nebo varianty vytvořené metodami rekombinantní DNA.

Proteiny kódované různými variantami molekul nukleové kyseliny podle vynálezu vykazují určité společné vlastnosti, jako je enzymová aktivita, molekulová hmotnost, imunologická reaktivita nebo konformace nebo fyzikální vlastnosti, jako je elektroforetická pohyblivost, chování při chromatografii, sedimentační koeficienty, rozpustnost, spektroskopické vlastnosti, stabilita, optimální pH, optimální teplota.

V dalším výhodném provedení se vynález týká molekul nukleové kyseliny, které specificky hybridizují s transkripty molekul nukleové kyseliny. Tyto molekuly nukleové kyseliny jsou výhodně oligonukleotidy, které jsou dlouhé alespoň 10, zejména alespoň 15 a obzvláště výhodně alespoň 50 nukleotidů. Molekuly nukleové kyseliny a oligonukleotidy

vynálezu mohou být použity například jako primery pro reakci PCR (polymerázová řetězová reakce). Mohou být také složky "antisense" konstruktů (konstruktů s opačnou orientací) nebo molekul DNA kódujících vhodné ribozymy.

Vynález se dále týká vektorů obsahujících molekuly nukleové kyseliny vynálezu. Výhodně jsou plazmidy, kosmidy, viry, bakteriofágy a další vektory obvykle používané na poli genetického inženýrství.

Sekvence nukleové kyseliny podle vynálezu je výhodně operativně spojena s regulačními prvky ve vektoru podle vynálezu, což zaručuje transkripci a syntézu RNA v prokaryotických a/nebo eukaryotických buňkách, která může být translatována.

Expresní vektory podle vynálezu umožňují produkci enzymů syntetizujících fruktosylové polymery s krátkým řetězcem v různých hostitelských organismech.

Kódované enzymy mohou být použity pro produkci fruktosylových polymerů s krátkým řetězcem také mimo hostitelské organismy. Takto mohou být použity pro produkci fruktosylových polymerů s krátkým řetězcem fermentační a další biotechnologické metody. Například je také představitelné, že fruktosylové polymery budou produkovány prostřednictvím imobilizovaných enzymů.

Podle vynálezu jsou výhodné regulační prvky promotoru patatinu B33. Další výhodné promotory jsou promotor 35S CaMV a promotor genu alkoholdehydrogenázy ze *Saccharomyces cerevisiae*.

Vektory podle vynálezu mohou mít další funkční jednotky ovlivňující stabilizaci vektoru v hostitelském organismu, jako je bakteriální počátek replikace nebo 2- μ DNA pro účel stabilizace v *Saccharomyces cerevisiae*. Mimoto mohou být obsaženy sekvence „levé hranice“ a „pravé hranice“ T-DNA z *Agrobacterium*, čímž se umožní stabilní integrace do genomu rostlin.

Navíc vektory podle vynálezu mohou obsahovat funkční terminátory, jako je terminátor genu oktopinsyntetázy z *Agrobacterium*.

Aby se enzym transportoval do různých buněčných kompartmentů, je v dalším provedení molekula nukleové kyseliny vynálezu spojena s vektorem vynálezu molekulou nukleové kyseliny kódující funkční signální sekvenci. Touto modifikací může být například přidání N-koncové signální sekvence pro sekreci do prostoru buněčné membrány vyšších rostlin, ale předmětem vynálezu může být také každá další modifikace, která vede k fúzi signální sekvence s kódovanou fruktosyltransferázou.

V obzvláště výhodném provedení se vynález týká plazmidu pB33-cySST, jehož konstrukce je popsána v příkladech (obr. 1).

Expresí molekul nukleové kyseliny podle vynálezu v prokaryotických buňkách, například v *Escherichia coli*, je zajímavá, protože tímto způsobem je možné přesněji charakterizovat enzymatické aktivity enzymů kódujících tyto molekuly.

V dalším provedení se vynález týká hostitelských buněk přechodně nebo stabilně obsahujících molekuly nukleové kyseliny nebo vektory vynálezu. Hostitelskou buňkou se rozumí organismus, který je schopen zavedení *in vitro* rekombinantní DNA a pak eventuálně syntetizovat proteiny kódované molekulami nukleové kyseliny podle vynálezu.

Výhodně jsou tyto buňky prokaryotické nebo eukaryotické buňky. Vynález se zejména týká rostlinných buněk obsahujících vektorové systémy podle vynálezu nebo jejich deriváty či části. Výhodně jsou schopné syntetizovat enzymy pro produkci fruktosylových polymerů s krátkým řetězcem díky faktu, že do nich byly vneseny vektorové systémy podle vynálezu, jejich deriváty nebo části. Buňky vynálezu jsou výhodně charakterizovány faktem, že zavedená molekula nukleové kyseliny vynálezu je buď heterologní vzhledem k transformované buňce, tj. v těchto buňkách se přirozeně nevyskytuje, nebo je v genomu lokalizována na jiném místě, než příslušná přirozeně se vyskytující sekvence.

Další provedení vynálezu se týká proteinů kódovaných molekulami nukleové kyseliny podle vynálezu, a také způsobů jejich přípravy, kterými se

hostitelská buňka vynálezu pěstuje za podmínek umožňujících syntézu proteinu, a protein je pak izolován z pěstovaných buněk a/nebo kultivačního média. Kromě toho se vynález týká SST, které mohou být produkovány rostlinami podle vynálezu.

Poskytnutím molekul nukleové kyseliny podle vynálezu je nyní možné produkovat fruktosylové polymery s krátkým řetězcem v každém organismu prostřednictvím genetického inženýrství, zatímco až dosud nebylo možné rostliny modifikovat konvenčními metodami, například křížením, tak, aby byly schopné syntetizovat fruktosylové polymery. Zvýšením aktivity proteinů vynálezu, například nadměrnou expresí ("overexpresí") vhodných molekul nukleové kyseliny nebo poskytnutím mutant, které již nadále nepodléhají buněčně specifickým regulačním mechanismům a/nebo které mají změněné teplotní závislosti vzhledem k jejich aktivitě, je možné zvýšit výtěžek v rostlinách modifikovaných genetickým inženýrstvím.

Nyní je tudíž možná exprese molekul nukleové kyseliny podle vynálezu v rostlinných buňkách, aby se zvýšila aktivita příslušné SST nebo aby se SST zavedla do buněk, které normálně tento enzym neexprimují. Nadto je možné modifikovat molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu metodami odborníkově známými, aby se získaly SST podle vynálezu, které již nadále nepodléhají buněčně specifickým regulačním mechanismům nebo které mají změněnou teplotní závislost nebo specifčnost k substrátu či produktu.

Když jsou molekuly nukleové kyseliny exprimovány v rostlinách, může být syntetizovaný protein lokalizovaný v jakémkoliv kompartmentu rostlinné buňky. Aby se dosáhlo lokalizace ve specifickém kompartmentu, musí být odstraněna sekvence zaručující lokalizaci ve vakuole, a je-li nutné, zbylá kódující oblast musí být spojena se sekvencemi DNA zaručujícími lokalizaci ve specifickém kompartmentu. Takové sekvence jsou známy (viz např. Braun et al., EMBO J., 11, 1992, 3219-3227; Wolter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 1988, 846-850; Sonnewald et al., Plant J., 1, 1991, 95-106).

Předkládaný vynález se tudíž také týká transgenních rostlinných buněk, které byly transformovány jednou nebo několika molekulami nukleové kyseliny podle vynálezu, a také transgenních rostlinných buněk pocházejících z takových transformovaných buněk. Takové buňky obsahují jednu nebo několik molekul nukleové kyseliny podle vynálezu, které jsou výhodně spojeny s regulačními DNA prvky zaručujícími transkripci v rostlinných buňkách, zejména s promotorem. Takové rostlinné buňky se odlišují od přirozeně se vyskytujících rostlinných buněk tím, že obsahují alespoň jednu molekulu nukleové kyseliny podle vynálezu, která se v těchto buňkách přirozeně nevyskytuje, nebo tím, že tato molekula je zavedena do genomu buňky na místo, kde se přirozeně nevyskytuje, tj. do jiné genomové oblasti.

Z transgenních rostlinných buněk mohou být regenerovány celé rostliny použitím metod odborníkům známým. Předmět předkládaného vynálezu se týká rostlin, které lze získat regenerací transgenních rostlinných buněk podle vynálezu.

Dále se předmět vynálezu týká rostlin obsahujících transgenní rostlinné buňky popsané výše. Transgenní rostliny mohou být v podstatě rostliny jakéhokoli rostlinného druhu, tj. jak jednoděložné, tak dvouděložné. Výhodně jsou to plodiny, zejména rostliny, které syntetizují a/nebo ukládají škrob, jako jsou pšenice, ječmen, rýže, kukuřice, řepa cukrovka, cukrová třtina nebo brambory. Zejména výhodně jsou rostliny ukládající sacharózu.

Vynález se také týká rozmnožovacího materiálu a produktů sklizně rostlin podle vynálezu, například ovoce, semen, hlíz, podnoží, sadby, řízků apod.

Transgenní rostlinné buňky a rostliny vynálezu syntetizují fruktosylové polymery s krátkým řetězcem díky expresi nebo dodatečné expresi alespoň jedné molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu.

Předmět vynálezu se proto také týká fruktosylových polymerů s krátkým řetězcem získatelných z transgenních rostlinných buněk a rostlin podle vynálezu, jakož i z rozmnožovacího materiálu a produktů sklizně.

Transgenní rostlinné buňky podle vynálezu mohou být regenerovány na celé rostliny metodami odborníkovi známými. Proto se předmět vynálezu také týká rostlin obsahujících transgenní rostlinné buňky podle vynálezu. Tyto rostliny jsou výhodně plodiny, zejména rostliny, které syntetizují a/nebo ukládají sacharózu a/nebo škrob. Zejména výhodná je brambora. Vynález se také týká rozmnožovacího materiálu rostlin podle vynálezu, obzvláště hlíz.

Aby se v rostlinných buňkách exprimovaly molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu v "sense" (tj. souhlasně s normálním smyslem transkripce) nebo "antisense" (tj. proti směru normální transkripce) orientaci, jsou spojeny s regulačními DNA prvky, které zaručují transkripci v rostlinných buňkách. To jsou zejména promotory. V podstatě je pro expresi vhodný jakýkoliv promotor aktivní v rostlinných buňkách.

Promotor může být vybrán tak, že exprese se uskuteční konstitutivně nebo pouze v určitém pletivu, na určitém stupni vývoje rostliny nebo v určité době určené vnějšími podněty. Vzhledem k rostlině může být promotor homologní nebo heterologní. Vhodné promotory jsou například promotor 35S RNA z viru mozaiky kvěťáku a ubichitinový promotor z kukuřice pro konstitutivní expresi, zejména výhodný je promotor genu patatinu B33 (Rocha-Sosa et al., EMBO J., 8, 1989, 23-29) pro expresi specifickou pro hlízu u brambor nebo promotor zaručující pouze expresi ve fotosynteticky aktivním pletivu, například promotor ST-LS1 (Stockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1987, 7943-7947; Stockhaus et al., EMBO J., 8, 1989, 2445-2451), nebo expresi specifickou pro endosperm promotory HMG ze pšenice, promotor USP, promotor faseolinu nebo promotory zeinových genů z kukuřice.

Kromě toho zde může být terminační sekvence sloužící pro správné ukončení transkripce, a také připojení konce poly-A k transkriptu, což je funkce nutná pro stabilizaci transkriptů. Tyto prvky jsou popsány v odborné literatuře (srov. Gielen et al., EMBO J., 8, 1989, 23-29) a mohou být libovolně zaměňovány.

Pro zavádění cizích genů do vyšších rostlin existuje velký počet dostupných klonovacích vektorů obsahujících replikační signál pro *E. coli* a genový marker pro selekci transformovaných bakteriálních buněk. Příklady těchto vektorů jsou pBR322, vektory řady pUC, řady M13mp, pACYC184 apod. Požadovaná sekvence může být vložena do vektoru ve vhodném štěpném místě. Získaný plazmid je vhodný pro transformaci buněk *E. coli*. Transformované buňky *E. coli* jsou pak pěstovány ve vhodném médiu, poté jsou sklizeny a lyzovány. Plazmid je regenerován. Jako analytické metody pro charakterizaci regenerované plazmidové DNA se obvykle používají restriční analýzy, gelové elektroforézy a další biochemické nebo molekulárně biologické metody. Po každé manipulaci může být plazmidová DNA štěpena a regenerované fragmenty DNA spojeny s dalšími sekvencemi DNA. Každá plazmidová DNA sekvence může být klonována do téhož nebo jiného plazmidu.

Pro zavedení DNA do rostlinné hostitelské buňky je dostupný velký počet metod. Tyto metody zahrnují transformaci rostlinných buněk s T-DNA pomocí *Agrobacterium tumefaciens* nebo *Agrobacterium rhizogenes* jako prostředků transformace, fúzi protoplastů, injekci, elektroporaci DNA, zavedení DNA prostřednictvím biolistických metod, jakož i další možnosti.

Pro injekci a elektroporaci DNA do rostlinných buněk nejsou na použité plazmidy žádné specifické požadavky. Mohou být použity jednoduché plazmidy, jako jsou deriváty pUC. Jestli mají být z takto transformovaných buněk regenerovány celé rostliny, měl by se použít marker pro selekci.

V závislosti na metodě pro zavedení požadovaných genů do rostlinné buňky mohou být nezbytné další sekvence DNA. Jestliže je například pro

transformaci rostlinné buňky použít plazmid Ti nebo Ri, alespoň pravý hraniční úsek, ale často pravý a levý hraniční úsek T-DNA plazmidu Ti a Ri musí být připojen jako hraniční úsek ke genům, které mají být do buňky zavedeny.

Jestliže se pro transformaci použije *Agrobacterium*, musí být zaváděná DNA klonována do specifických plazmidů, a sice buďto do intermediárního nebo do binárního vektoru. Intermediární vektory mohou být integrovány homologní rekombinací do plazmidu Ti nebo Ri v *Agrobacterium* díky sekvencím, které jsou homologní k sekvencím v T-DNA. Plazmid Ti nebo Ri dále obsahuje úsek *vir* nezbytný pro přenos T-DNA. Intermediární vektory se nemohou replikovat v *Agrobacterium*. Prostřednictvím pomocného (helper) plazmidu může být intermediární vektor přenesen do *Agrobacterium tumefaciens* (konjugací). Binární vektory se mohou replikovat jak v *E. coli*, tak i v *Agrobacterium*. Obsahují markerový gen pro selekci a linker nebo polylinker (klonovací nebo mnohočetné klonovací místo) ohraničený pravým a levým T-DNA hraničním úsekem. Mohou být transformovány přímo do *Agrobacterium* (Holsters et al., Mol. Gen. Genet., 163, 1978, 181-187). *Agrobacterium* sloužící jako hostitelská buňka by mělo obsahovat plazmid nesoucí úsek *vir*. Úsek *vir* je nezbytný pro přenos T-DNA do rostlinné buňky. Může zde být i další T-DNA. *Agrobacterium* takto transformované se pak použije pro transformaci rostlinných buněk. Použití T-DNA pro transformaci rostlinných buněk bylo rozsáhle zkoumáno a popsáno v dokumentech EP-A-120 516; Hoekema: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam, 1985, Chapter V, Fraley et al., Crit. Rev. Plant. Sci., 4, 1-46, a An et al., EMBO J., 4, 1985, 277-287.

Pro přenos DNA do rostlinných buněk se rostlinné explantáty kultivují společně s *Agrobacterium tumefaciens* nebo *Agrobacterium rhizogenes*. Z infikovaného rostlinného materiálu (jako jsou např. kousky listů, části stonku, kořeny, ale také protoplasty nebo rostlinné buňky kultivované v suspenzi) mohou být regenerovány celé rostliny ve vhodném médiu, které

může obsahovat antibiotika nebo biocidní látky pro selekci transformovaných buněk. Rostliny získané tímto způsobem mohou být testovány na přítomnost zavedené DNA. Jsou známy další možnosti zavádění cizorodé DNA za použití biolistických metod nebo transformací protoplastů (srov. např. Willmitzer, L., 1993, Transgenic plants. In: Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, eds.), Vol. 2, 627-659, VCH Weinheim-New York-Basel-Cambridge).

Alternativní systémy pro transformaci jednoděložných rostlin jsou transformace pomocí biolistického přístupu, elektricky nebo chemicky vyvolané zavedení DNA do protoplastů, elektroporace částečně permeabilizovaných buněk, makroinjekce DNA do květů, mikroinjekce DNA do mikropsór a proembryí, introdukce DNA do klíčících pylových zrn a zavedení DNA do embryí bobtnáním (přehled viz: Potrykus, Physiol. Plant, 1990, 269-273).

Zatímco transformace dvouděložných rostlin prostřednictvím vektorového systému plazmidu Ti s pomocí *Agrobacterium tumefaciens* je dobře zavedena, novější výzkumné práce naznačují, že také jednoděložné rostliny jsou přístupné pro transformaci prostřednictvím vektorů založených na *Agrobacterium* (Chan et al., Plant Mol. Biol., 22, 1993, 491-506; Hiei et al., Plant J., 6, 1994, 271-282; Bytebier et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1987, 5345-5349; Raineri et al., Bio/Technology, 8, 1990, 33-38; Gould et al., Plant Physiol., 95, 1991, 426-434; Mooney et al., Plant, Cell Tiss. & Org. Cult., 25, 1991, 209-218; Li et al., Plant Mol. Biol., 20, 1992, 1037-1048).

Tři z výše uvedených transformačních systémů mohou být použity také pro různé obilniny: elektroporace tkání, transformace protoplastů a přenos DNA ostřelováním regenerativní tkáně a buněk částicemi (přehled viz: Jähne et al., Euphytica, 85, 1995, 35-44).

V odborné literatuře byla také často popisována transformace pšenice (přehled viz: Maheshwari et al., Critical Reviews in Plant Science, 14(2), 1995, 149-178).

Vynález se také týká rostlin obsahujících alespoň jednu, ale výhodně velké množství buněk, obsahujících vektorové systémy podle vynálezu nebo deriváty či jejich části, které jsou schopny syntetizovat enzymy pro produkci fruktosylových polymerů s krátkým řetězcem díky zavedení vektorových systémů, derivátů nebo částí vektorových systémů podle vynálezu. Vynález také poskytuje rostliny mnoha různých druhů, rodů, čeledí, řádů a tříd, které jsou schopné syntetizovat enzymy pro produkci fruktosylových polymerů s krátkým řetězcem díky zavedeným vektorovým systémům nebo derivátům nebo jejich částem. Protože známé rostliny nejsou schopny produkovat fruktosylové polymery s krátkým řetězcem, je snadné kontrolovat, zda byla metoda úspěšně provedena, například chromatografickou analýzou cukrů obsahujících fruktózu. Naproti tomu je výhodné, že několik málo rostlin obsahuje fruktosylové polymery, protože tím jsou definované molekulové hmotnosti, tj. velikost fruktosylového polymeru s krátkým řetězcem. Nadto je možná lokalizace v různých buněčných kompartmentech a různých orgánech, jakož i zvýšení exprese, a tedy i výtěžku.

V dalším provedení se vynález týká metod produkce fruktosylových polymerů s krátkým řetězcem zahrnujících:

a) kontakt sacharózy nebo ekvivalentního substrátu s SST podle vynálezu za podmínek umožňujících konverzi na fruktosylové polymery s krátkým řetězcem, a

b) získání fruktosylových polymerů tvořených tímto způsobem.

Povaha vytvořených fruktosylových polymerů závisí na enzymové specifitě fruktosyltransferázy. Když je použita SST podle vynálezu, tvoří se nejspíš kestóza, ale také nystóza a fruktosylnystóza.

Kromě toho se vynález týká fruktosylových polymerů produkovaných rostlinnou buňkou nebo rostlinou podle vynálezu nebo získaných rozmnožovacího materiálu nebo produktů sklizně rostlin nebo rostlinných buněk podle vynálezu nebo získaných výše popsáním způsobem podle vynálezu. Tyto fruktosylové polymery mohou být výhodně použity pro produkci potravin, jako je pečivo nebo těstoviny. Výhodně mohou být tyto fruktosylové polymery použity pro zvýšení viskozity vodných systémů, jako detergenty, jako suspendující činidla nebo pro urychlení sedimentačního procesu a komplexování, ale také pro vázání vody.

Přehled obrázků

Obrázek 1: ukazuje konstrukci plazmidu pB33-cySST.

Vektor: pBinB33 (derivát pBin19; Bevan, 1984, Nucl. Acids Res., 12: 8711)

promotor: promotor B33 (Rocha-Sosa et al., 1989, EMBO J., 8: 23-29)

donor: *Solanum tuberosum*

kódující úsek: gen SST z *Cynars scolymus*

orientace: sense

terminátor: polyadenylační signál z genu oktopinsyntetázy z *A. tumefaciens*,
plazmid pTiACH5 (Gielen et al., 1984, EMBO J., 3: 835-846)

donátor: *Agrobacterium tumefaciens*

rezistence: kanamycin

Obrázek 2: ukazuje analýzu rozpustných cukrů v hlízách transgenních rostlin, které byly tvořeny za použití vektorového systému pB33-cySST. Fruktosylové polymery s krátkým řetězcem (zejména 1-kestóza) vytvořené díky genetické modifikaci jsou označeny.

Obrázek 3: ukazuje analýzu rozpustných cukrů v transgenních rostlinách, které byly tvořeny za použití vektorového systému pB33-cySST a p35S-cySST, ve srovnání s rostlinami divokého typu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Identifikace, izolace a charakterizace cDNA kódující sacharózo-fruktosyltransferázu závislou na sacharóze z artyčoku (*Cynare scolymus*)

Z květních disků artyčoku byla izolována celková RNA (Sambrook et al., viz výše). Poly(A)⁺ mRNA se izolovala za použití mRNA izolačního systému PolyATtract (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Komplementární DNA (cDNA) se syntetizovala z 5 µg této RNA pomocí soupravy pro syntézu "ZAp-cDNA synthesis kit" od firmy Stratagene podle instrukcí výrobce. Získalo se 2×10^6 nezávislých rekombinantních fágů. Amplifikovaná cDNA knihovna se testovala obvyklými metodami pomocí fragmentu DNA značeného ³²P a odpovídajícího 3'-konci z 6-SFT cDNA (Sprenger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 1995, 11652) o délce 392 bp. Tento fragment se získal pomocí RT-PCR (užitím soupravy "RT-PCR Kit", Stratagene, Heidelberg, Germany) z kompletní RNA z primárních listů ječmene indukovaných světlem (72 hodin). Pozitivní klony se dále analyzovaly.

Příklad 2

Sekvenční analýza inzertu cDNA plazmidu pCy21

Plazmidová DNA byla izolována z klonu pCy21. Sekvence inzertu cDNA se určovala obvyklými metodami pomocí dideoxynukleotidové metody (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 1977, 5463-5467).

Inzert klonu pCy21 je DNA o délce 2055 bp. Nukleotidová sekvence je uvedena v sekvenci id. č. 1. Odpovídající aminokyselinová sekvence je uvedena v sekvenci id. č. 2.

Sekvenční analýza a srovnání s již publikovanými sekvencemi ukázaly, že sekvence uvedená v sekvenci id. č. 1 je nová a zahrnuje kódující úsek vykazující homologie s SST z jiných organismů.

Příklad 3

Příprava plazmidu pB33-cySST a zavedení plazmidu do genomu brambory

Plazmid pB33-cySST obsahuje tři fragmenty A, B a C v binárním vektoru pBin19 (Bevan, 1984, Nucl. Acids Res., 12: 8711, modifikováno podle Becker, 1990, Nucl. Acids Res., 18: 203) (srov. obr. 1). Fragment A obsahuje promotor B33 patatinového genu b33 z brambory. Obsahuje fragment DraI (pozice -1512 až pozice +14) patatinového genu B33 (Rocha-Sosa et al., 1989, EMBO J., 8:23-29), který je vložen mezi štěpná místa EcoRI a SacI polylinkeru z pBin19-Hyg. Fragment B obsahuje kódující úsek sekvence uvedené v sekvenci id. č. 1. Fragment B byl získán jako fragment NotI s tupými konci z vektoru pBluescript SK, ve kterém je vložen do štěpného místa EcoRI prostřednictvím EcoRI/NotI sekvence linkeru. Fragment C obsahuje polyadenylační signál genu 3 z T-DNA Ti plasmidu pTi

ACH 5 (Gielen et al., 1984; EMBO J., 3, 835-846), nukleotidy 11749 – 11939, který byl izolován jako fragment Pvu II-Hind III z plazmidu pAGV 40 (Herrera-Estrella et al., 1983, Nature, 303, 209 - 213) a klonován mezi štěpná místa SphI a Hind III polylinkeru z pBin19-Hyg po přidání linkerů Sph I ke štěpnému místu PvuII. Plazmid pB33-cySST má velikost přibližně 14 kb. Tento plazmid byl zaveden do *Agrobacterium* (Höfgen and Willmitzer, Nucleic Acids Res., 16, 1988, 9877).

Plazmid pB33-cySST byl zaveden do rostlin brambor prostřednictvím genového přenosu vyvolaného *Agrobacterium* užitím výše popsaných obvyklých metod. Celé rostliny byly regenerovány z transformovaných buněk. Z regenerovaných rostlin byly získány enzymové extrakty a ty byly testovány na přítomnost fruktosylových polymerů. Analýza se prováděla jak popisuje Röber (Planta, 199, 528-536). Analýza hlíz velkého počtu transformovaných rostlin transformovaných tímto vektorem jasně ukázala výskyt fruktosylových polymerů s krátkým řetězcem, zejména 1-kestózy, který může být přisouzen expresi genu SST podle vynálezu (srov. obr. 2).

Příklad 4

Analýza rozpustných cukrů u rostlin divokého typu a transgenních rostlin obsahujících SST

Byly připraveny transgenní rostliny obsahující vektory pB33-cySST a 35S-cySST (mající kódující úsek sekvence id. č. 1 pod kontrolou promotoru 35S) tak, jak je popsáno v příkladu 3. Z transgenních rostlin a z rostlin divokého typu se získaly extrakty a vyšetřovaly se na přítomnost fruktosylových polymerů, viz příklad 3. Analýza HPAEC ukázaná na obrázku 3 dokazuje produkci oligofruktanů. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce 1.

Tabulka 1

Rozpustné cukry (sacharóza a oligofruktan) u rostlin divokého typu (WT) a transgenních rostlin

linie	sacharóza	1-kestóza	nystóza	F-nystóza
WT 1 (Désirée)	2,09	-	-	-
WT 2 (Désirée)	1,67	-	-	-
B33-cySST 6	2,26	3,58	1,60	-
B33-cySST 54	5,13	3,06	2,90	0,23
35S-cySST 18	4,08	4,05	1,51	0,12
35S-cySST 22	4,80	4,14	2,19	< 0,1

Hodnoty uvedeny v g cukru na kg čerstvé hmotnosti

Jak je zjevné z obrázku 3 a tabulky 1, obsah fruktosylových polymerů, zejména 1-kestózy, převyšuje obsah sacharózy. Tedy pokusy provedené podle předkládaného vynálezu dokazují použitelnost molekul nukleové kyseliny vynálezu pro produkci fruktosylových polymerů v transgenních rostlinách.

SEZNAM SEKVENCÍ

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 2226 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: Cynara Scolymus

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
- (B) POZICE: 8..1918

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 1:

CCACCAC	ATG	GCT	TCC	TCT	ACC	ACC	ACC	CCA	CTC	CTC	CCT	CAC	CAC	CAC		49
	Met	Ala	Ser	Ser		Thr	Thr	Pro	Leu	Leu	Pro	His	His	His		
	1					5				10						
CTT	CAG	AAC	CCG	CAA	CAA	CTC	GCC	GGA	TCT	CCG	GCA	GCT	CAT	CGT	CTA	97
Leu	Gln	Asn	Pro	Gln	Gln	Leu	Ala	Gly	Ser	Pro	Ala	Ala	His	Arg	Leu	
15					20					25					30	
TCC	CGA	CCC	ACA	CTC	CTT	TCT	GGG	ATC	CTT	GTT	TCG	GTC	CTA	GTC	ATC	145
Ser	Arg	Pro	Thr	Leu	Leu	Ser	Gly	Ile	Leu	Val	Ser	Val	Leu	Val	Ile	
				35					40					45		
TGT	GCT	CTC	GTT	GCT	GTA	ATC	CAC	AAC	CAA	TCA	CAG	CAA	CCC	TAC	CAT	193
Cys	Ala	Leu	Val	Ala	Val	Ile	His	Asn	Gln	Ser	Gln	Gln	Pro	Tyr	His	
			50					55					60			
GAC	GGC	GGA	GCT	AAA	CCC	TCC	TCC	TCC	GCC	GCT	ACC	ACC	ACC	TTC	CCA	241
Asp	Gly	Gly	Ala	Lys	Pro	Ser	Ser	Ser	Ala	Ala	Thr	Thr	Thr	Phe	Pro	
		65					70					75				
ACA	GCG	TCG	CCA	GAA	GCT	GGT	TTG	AAA	CGG	TTT	CCC	ATT	GAG	TTG	AAA	289
Thr	Ala	Ser	Pro	Glu	Ala	Gly	Leu	Lys	Arg	Phe	Pro	Ile	Glu	Leu	Lys	
		80				85					90					
ACG	AAT	GCT	GAG	GTT	GAG	TGG	CAA	CGC	TCG	GCT	TAC	CAT	TTT	CAG	CCC	337
Thr	Asn	Ala	Glu	Val	Glu	Trp	Gln	Arg	Ser	Ala	Tyr	His	Phe	Gln	Pro	
95					100					105				110		
GAT	AAG	AAC	TAC	ATT	AGC	GAT	CCT	GAT	GGC	CCA	ATG	TAT	CAC	ATG	GGG	385
Asp	Lys	Asn	Tyr	Ile	Ser	Asp	Pro	Asp	Gly	Pro	Met	Tyr	His	Met	Gly	
				115					120					125		

TGG TAT CAT CTC TTC TAT CAG TAC AAT CCA GAG TCT GCC ATC TGG GGG Trp Tyr His Leu Phe Tyr Gln Tyr Asn Pro Glu Ser Ala Ile Trp Gly 130 135 140	433
AAC ATC ACA TGG GGC CAC TCC GTA TCC AAA GAC ATG ATC AAC TGG TTC Asn Ile Thr Trp Gly His Ser Val Ser Lys Asp Met Ile Asn Trp Phe 145 150 155	481
CAT CTC CCC TTC GCC ATG GTC CCT GAC CAA TGG TAC GAT ATC GAA GGT His Leu Pro Phe Ala Met Val Pro Asp Gln Trp Tyr Asp Ile Glu Gly 160 165 170	529
GTC ATG ACC GGC TCC GCC ACC GTC CTC CCT GAC GGT CAG ATC ATC ATG Val Met Thr Gly Ser Ala Thr Val Leu Pro Asp Gly Gln Ile Ile Met 175 180 185 190	577
CTC TAC ACC GGC AAC GCG TAC GAT CTC TCG CAA CTG CAA TGC TTA GCA Leu Tyr Thr Gly Asn Ala Tyr Asp Leu Ser Gln Leu Gln Cys Leu Ala 195 200 205	625
TAT GCC GTC AAC TCG TCT GAT CCC CTC CTC CTC GAT TGG AAA AAG TAC Tyr Ala Val Asn Ser Ser Asp Pro Leu Leu Leu Asp Trp Lys Lys Tyr 210 215 220	673
GAG GGA AAT CCC ATC TTG TTC CCA CCT CCT GGG GTG GGA TAC AAG GAT Glu Gly Asn Pro Ile Leu Phe Pro Pro Pro Gly Val Gly Tyr Lys Asp 225 230 235	721
TTT CGG GAC CCA TCT ACA CTG TGG TTG GGT CCC GAT GGT GAA TAC AGA Phe Arg Asp Pro Ser Thr Leu Trp Leu Gly Pro Asp Gly Glu Tyr Arg 240 245 250	769
ATG GTA ATG GGG TCC AAG CAT AAC GAG ACC ATC GGT TGT GCC TTG ATT Met Val Met Gly Ser Lys His Asn Glu Thr Ile Gly Cys Ala Leu Ile 255 260 265 270	817
TAC CAT ACC ACT AAT TTT ACG CAT TTC GAG CTC AAG GAA GAG GTG CTT Tyr His Thr Thr Asn Phe Thr His Phe Glu Leu Lys Glu Glu Val Leu 275 280 285	865
CAC GCC GTT CCC CAC ACG GGT ATG TGG GAA TGT GTG GAT CTT TAT CCG His Ala Val Pro His Thr Gly Met Trp Glu Cys Val Asp Leu Tyr Pro 290 295 300	913
GTA TCC ACC ACG CAC ACA AAC GGG TTG GAC ATG GTG GAT AAC GGG CCG Val Ser Thr Thr His Thr Asn Gly Leu Asp Met Val Asp Asn Gly Pro 305 310 315	961
AAT GTG AAG CAT GTG TTG AAA CAA AGT GGG GAT GAA GAT CGA CAT GAT Asn Val Lys His Val Leu Lys Gln Ser Gly Asp Glu Asp Arg His Asp 320 325 330	1009
TGG TAT GCG CTC GGG ACT TAT GAC GTC GTG AAT GAT AAG TGG TAT CCA Trp Tyr Ala Leu Gly Thr Tyr Asp Val Val Asn Asp Lys Trp Tyr Pro 335 340 345 350	1057

GAT GAC CCT GAA AAC GAT GTG GGT ATC GGG TTA AGA TAC GAT TTC GGA Asp Asp Pro Glu Asn Asp Val Gly Ile Gly Leu Arg Tyr Asp Phe Gly 355 360 365	1105
AAG TTT TAT GCG TCA AAG ACG TTC TAC GAC CAA CAT AAG AAG AGA CGG Lys Phe Tyr Ala Ser Lys Thr Phe Tyr Asp Gln His Lys Lys Arg Arg 370 375 380	1153
GTC CTT TGG GGT TAC GTT GGA GAA ACC GAT CCC CCT AAA TAC GAC GTT Val Leu Trp Gly Tyr Val Gly Glu Thr Asp Pro Pro Lys Tyr Asp Val 385 390 395	1201
TAC AAG GGA TGG GCT AAC ATT TTG AAC ATT CCA AGG ACC ATA GTT TTG Tyr Lys Gly Trp Ala Asn Ile Leu Asn Ile Pro Arg Thr Ile Val Leu 400 405 410	1249
GAC ACG AAA ACG AAT ACC AAT TTG ATT CAA TGG CCA ATT GCG GAA GTC Asp Thr Lys Thr Asn Thr Asn Leu Ile Gln Trp Pro Ile Ala Glu Val 415 420 425 430	1297
GAA AAC TTG AGA TCG AAT AAA TAC AAT GAA TTC AAA GAC GTG GAG CTG Glu Asn Leu Arg Ser Asn Lys Tyr Asn Glu Phe Lys Asp Val Glu Leu 435 440 445	1345
AAA CCG GGA TCA CTG ATT CCG CTC GAG ATA GGC ACA GCA ACA CAG TTG Lys Pro Gly Ser Leu Ile Pro Leu Glu Ile Gly Thr Ala Thr Gln Leu 450 455 460	1393
GAT ATA ACT GCG ACA TTC GAA GTT GAT CAA ACG ATG TTG GAA TCG ACG Asp Ile Thr Ala Thr Phe Glu Val Asp Gln Thr Met Leu Glu Ser Thr 465 470 475	1441
CTT GAA GCC GAT GTT TTG TTC AAT TGT ACG ACC AGT GAA GGT TCA GCC Leu Glu Ala Asp Val Leu Phe Asn Cys Thr Thr Ser Glu Gly Ser Ala 480 485 490	1489
GGG AGA GGG GTG TTG GGG CCA TTT GGA CTG GTG GTT CTA GCT GAT GCC Gly Arg Gly Val Leu Gly Pro Phe Gly Leu Val Val Leu Ala Asp Ala 495 500 505 510	1537
GAA CGA TCT GAG CAA CTT CCT GTG TAT TTC TAT ATA GCA AAA GAC ACC Glu Arg Ser Glu Gln Leu Pro Val Tyr Phe Tyr Ile Ala Lys Asp Thr 515 520 525	1585
GAT GGA TCC TCA AAA ACT TAC TTC TGT GCC GAT GAA TCA AGA TCA TCG Asp Gly Ser Ser Lys Thr Tyr Phe Cys Ala Asp Glu Ser Arg Ser Ser 530 535 540	1633
AAC GAT GTA GAC ATA GGG AAA TGG GTG TAC GGA AGC AGT GTT CCT GTT Asn Asp Val Asp Ile Gly Lys Trp Val Tyr Gly Ser Ser Val Pro Val 545 550 555	1681
CTA GAA GGC GAA AAA TTC AAC ATG AGG TTG CTG GTG GAT CAT TCA ATT Leu Glu Gly Glu Lys Phe Asn Met Arg Leu Leu Val Asp His Ser Ile 560 565 570	1729

Met	Ala	Ser	Ser	Thr	Thr	Thr	Pro	Leu	Leu	Pro	His	His	His	Leu	Gln
1				5					10					15	
Asn	Pro	Gln	Gln	Leu	Ala	Gly	Ser	Pro	Ala	Ala	His	Arg	Leu	Ser	Arg
			20					25					30		
Pro	Thr	Leu	Leu	Ser	Gly	Ile	Leu	Val	Ser	Val	Leu	Val	Ile	Cys	Ala
		35					40					45			

Leu Val Ala Val Ile His Asn Gln Ser Gln Gln Pro Tyr His Asp Gly
 50 55 60

Gly Ala Lys Pro Ser Ser Ser Ala Ala Thr Thr Thr Phe Pro Thr Ala
 65 70 75 80

Ser Pro Glu Ala Gly Leu Lys Arg Phe Pro Ile Glu Leu Lys Thr Asn
 85 90 95

Ala Glu Val Glu Trp Gln Arg Ser Ala Tyr His Phe Gln Pro Asp Lys
 100 105 110

Asn Tyr Ile Ser Asp Pro Asp Gly Pro Met Tyr His Met Gly Trp Tyr
 115 120 125

His Leu Phe Tyr Gln Tyr Asn Pro Glu Ser Ala Ile Trp Gly Asn Ile
 130 135 140

Thr Trp Gly His Ser Val Ser Lys Asp Met Ile Asn Trp Phe His Leu
 145 150 155 160

Pro Phe Ala Met Val Pro Asp Gln Trp Tyr Asp Ile Glu Gly Val Met
 165 170 175

Thr Gly Ser Ala Thr Val Leu Pro Asp Gly Gln Ile Ile Met Leu Tyr
 180 185 190

Thr Gly Asn Ala Tyr Asp Leu Ser Gln Leu Gln Cys Leu Ala Tyr Ala
 195 200 205

Val Asn Ser Ser Asp Pro Leu Leu Leu Asp Trp Lys Lys Tyr Glu Gly
 210 215 220

Asn Pro Ile Leu Phe Pro Pro Pro Gly Val Gly Tyr Lys Asp Phe Arg
 225 230 235 240

Asp Pro Ser Thr Leu Trp Leu Gly Pro Asp Gly Glu Tyr Arg Met Val
 245 250 255

Met Gly Ser Lys His Asn Glu Thr Ile Gly Cys Ala Leu Ile Tyr His
 260 265 270

Thr Thr Asn Phe Thr His Phe Glu Leu Lys Glu Glu Val Leu His Ala
 275 280 285

Val Pro His Thr Gly Met Trp Glu Cys Val Asp Leu Tyr Pro Val Ser
 290 295 300

Thr Thr His Thr Asn Gly Leu Asp Met Val Asp Asn Gly Pro Asn Val
 305 310 315 320

Lys His Val Leu Lys Gln Ser Gly Asp Glu Asp Arg His Asp Trp Tyr

Thr Gly Ile Ser Val Lys Ala Ser Leu Lys Ile Trp Lys Met Lys Glu
610 615 620

Ala Gln Leu Asp Pro Phe Pro Leu Ser Gly Trp Ser Ser
625 630 635

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 1911 párů bazí
- (B) TYP: nukleotid
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /popis = „syntetická DNA“

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
- (B) POZICE: 1..1911

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 3:

ATG GCA AGC TCT ACG ACT ACA CCG TTG TTA CCG CAC CAC CAT TTG CAG	48
Met Ala Ser Ser Thr Thr Thr Pro Leu Leu Pro His His His Leu Gln	
640 645 650	
AAT CCT CAG CAG TTG GCT GGA AGT CCA GCT GCA CAC AGG TTG AGT CGT	96
Asn Pro Gln Gln Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ala His Arg Leu Ser Arg	
655 660 665	
CCT ACT CTT TTG AGT GGT ATA TTG GTA AGT GTA CTG GTC ATC TGC GCA	144
Pro Thr Leu Leu Ser Gly Ile Leu Val Ser Val Leu Val Ile Cys Ala	
670 675 680 685	
TTG GTC GCA GTT ATA CAT AAT CAG TCT CAA CAG CCA TAC CAT GAT GGT	192
Leu Val Ala Val Ile His Asn Gln Ser Gln Gln Pro Tyr His Asp Gly	
690 695 700	
GGT GCC AAG CCT AGC TCT AGC GCT GCC ACG ACT ACT TTT CCT ACA GCC	240
Gly Ala Lys Pro Ser Ser Ser Ala Ala Thr Thr Thr Phe Pro Thr Ala	
705 710 715	
AGC CCT GAA GCA GGA TTG AAA AGA TTC CCT ATC GAA CTC AAG ACC AAC	288
Ser Pro Glu Ala Gly Leu Lys Arg Phe Pro Ile Glu Leu Lys Thr Asn	
720 725 730	

GCA GAA GTC GAG TGG CAG AGA AGT GCA TAC CAC TTC CAG CCA GAT AAG Ala Glu Val Glu Trp Gln Arg Ser Ala Tyr His Phe Gln Pro Asp Lys 735 740 745	336
AAC TAT ATC TCA GAC CCA GAC GGG CCT ATG TAC CAT ATG GGT TGG TAC Asn Tyr Ile Ser Asp Pro Asp Gly Pro Met Tyr His Met Gly Trp Tyr 750 755 760 765	384
CAC TTA TTC TAC CAA TAT AAT CCA GAG AGT GCA ATA TGG GGA AAT ATA His Leu Phe Tyr Gln Tyr Asn Pro Glu Ser Ala Ile Trp Gly Asn Ile 770 775 780	432
ACT TGG GGT CAT AGC GTT AGC AAG GAT ATG ATT AAT TGG TTT CAC TTG Thr Trp Gly His Ser Val Ser Lys Asp Met Ile Asn Trp Phe His Leu 785 790 795	480
CCA TTT GCG ATG GTC CCA GAT CAA TGG TAT GAT ATT GAG GGC GTT ATG Pro Phe Ala Met Val Pro Asp Gln Trp Tyr Asp Ile Glu Gly Val Met 800 805 810	528
ACT GGA AGC GCA ACT GTT TTG CCA GAC GGA CAG ATC ATT ATG TTG TAT Thr Gly Ser Ala Thr Val Leu Pro Asp Gly Gln Ile Ile Met Leu Tyr 815 820 825	576
ACC GGT AAT GCA TAC GAC TTG AGT CAG TTG CAG TGT CTC GCC TAT GCC Thr Gly Asn Ala Tyr Asp Leu Ser Gln Leu Gln Cys Leu Ala Tyr Ala 830 835 840 845	624
GTT AAT AGC AGC GAC CCC TTG TTG CTC GAT TGG AAG AAG TAC GAG GGC Val Asn Ser Ser Asp Pro Leu Leu Leu Asp Trp Lys Lys Tyr Glu Gly 850 855 860	672
AAT CCG ATT CTC TTT CCG CCT CCT GGC GTC GGA TAT AAA GAT TTC AGA Asn Pro Ile Leu Phe Pro Pro Pro Gly Val Gly Tyr Lys Asp Phe Arg 865 870 875	720
GAT CCC AGT ACT CTC TGG CTC GGT CCA GAC GGA GAG TAC CGT ATG GTC Asp Pro Ser Thr Leu Trp Leu Gly Pro Asp Gly Glu Tyr Arg Met Val 880 885 890	768
ATG GGC AGC AAA CAC AAT GAA ACA ATC GGG TGC GCA CTC ATC TAT CAC Met Gly Ser Lys His Asn Glu Thr Ile Gly Cys Ala Leu Ile Tyr His 895 900 905	816
ACG ACA AAC TTC ACG CAC TTC GAG CTC AAG GAA GAA GTC TTA CAC GCT Thr Thr Asn Phe Thr His Phe Glu Leu Lys Glu Glu Val Leu His Ala 910 915 920 925	864
GTT CCT CAC ACA GGA ATG TGG GAG TGC GTC GAC TTA TAT CCC GTC AGT Val Pro His Thr Gly Met Trp Glu Cys Val Asp Leu Tyr Pro Val Ser 930 935 940	912
ACT ACT CAT ACG AAT GGC TTG GAT ATG GTC GAC AAT GGT CCC AAC GTC Thr Thr His Thr Asn Gly Leu Asp Met Val Asp Asn Gly Pro Asn Val 945 950 955	960

AAA CAT GTC CTC AAG CAG TCC GGC GAC GAG GAC AGG CAC GAC TGG TAC	1008
Lys His Val Leu Lys Gln Ser Gly Asp Glu Asp Arg His Asp Trp Tyr	
960 965 970	
GCT TTA GGT ACA TAT GAC GTC GTC AAC GAC AAA TGG TAT CCC GAC GAT	1056
Ala Leu Gly Thr Tyr Asp Val Val Asn Asp Lys Trp Tyr Pro Asp Asp	
975 980 985	
CCC GAG AAC GAC GTC GGA ATT GGC CTT CGT TAC GAC TTC GGC AAG TTC	1104
Pro Glu Asn Asp Val Gly Ile Gly Leu Arg Tyr Asp Phe Gly Lys Phe	
990 995 1000 1005	
TAC GCC AGT AAA ACA TTC TAC GAT CAG CAC AAA AAA CGT CGT GTT TTA	1152
Tyr Ala Ser Lys Thr Phe Tyr Asp Gln His Lys Lys Arg Arg Val Leu	
1010 1015 1020	
TGG GGA TAC GTC GGC GAG ACG GAC CCG CCC AAA TAC GAT GTC TAC AAA	1200
Trp Gly Tyr Val Gly Glu Thr Asp Pro Pro Lys Tyr Asp Val Tyr Lys	
1025 1030 1035	
GGT TGG GCA AAT ATC CTC AAC ATA CCT CGC ACT ATT GTC CTC GAT ACG	1248
Gly Trp Ala Asn Ile Leu Asn Ile Pro Arg Thr Ile Val Leu Asp Thr	
1040 1045 1050	
AAG ACA AAC ACG AAC CTC ATA CAG TGG CCT ATT GCC GAG GTG GAG AAT	1296
Lys Thr Asn Thr Asn Leu Ile Gln Trp Pro Ile Ala Glu Val Glu Asn	
1055 1060 1065	
TTA CGT AGC AAC AAA TAC AAC GAG TTC AAG GAT GTG GAA TTG AAG CCT	1344
Leu Arg Ser Asn Lys Tyr Asn Glu Phe Lys Asp Val Glu Leu Lys Pro	
1070 1075 1080 1085	
GGA AGT TTG ATT CCG TTA GAA ATC GGT ACT GCT ACT CAA CTC GAC ATC	1392
Gly Ser Leu Ile Pro Leu Glu Ile Gly Thr Ala Thr Gln Leu Asp Ile	
1090 1095 1100	
ACC GCT ACT TTT GAG GTC GAT CAG ACC ATG CTC GAG AGT ACC TTA GAA	1440
Thr Ala Thr Phe Glu Val Asp Gln Thr Met Leu Glu Ser Thr Leu Glu	
1105 1110 1115	
GCG GAC GTA TTA TTT AAC TGT ACC ACA TCC GAG GGG AGC GCA GGT CGC	1488
Ala Asp Val Leu Phe Asn Cys Thr Thr Ser Glu Gly Ser Ala Gly Arg	
1120 1125 1130	
GGA GTC CTT GGT CCA TTC GGA CTT GTC GTC TTA GCG GAC GCA GAA AGA	1536
Gly Val Leu Gly Pro Phe Gly Leu Val Val Leu Ala Asp Ala Glu Arg	
1135 1140 1145	
AGC GAG CAG TTG CCC GTC TAT TTT TAC ATT GCC AAG GAC ACC GAC GGT	1584
Ser Glu Gln Leu Pro Val Tyr Phe Tyr Ile Ala Lys Asp Thr Asp Gly	
1150 1155 1160 1165	
TCC AGC AAG ACA TAC TTC TGC GCA GAT GAG TCC CGC AGC AGC AAC GAC	1632
Ser Ser Lys Thr Tyr Phe Cys Ala Asp Glu Ser Arg Ser Ser Asn Asp	
1170 1175 1180	

GTC GAT ATC GGC AAG TGG GTC TAT GGT TCG TCA GTC CCA GTG TTG GAG	1680
Val Asp Ile Gly Lys Trp Val Tyr Gly Ser Ser Val Pro Val Leu Glu	
1185 1190 1195	
GGA GAG AAA TTT AAC ATG CGC CTG CTT GTC GAC CAC AGC ATC GTC GAA	1728
Gly Glu Lys Phe Asn Met Arg Leu Leu Val Asp His Ser Ile Val Glu	
1200 1205 1210	
GGC TTC GCT CAG GGT GGC CGT ACT GTC GTA ACC AGT CGT GTC TAC CCT	1776
Gly Phe Ala Gln Gly Gly Arg Thr Val Val Thr Ser Arg Val Tyr Pro	
1215 1220 1225	
GCT AAA GCC ATA TAT GGG GCA GCC AAA CTC TTC CTC TTT AAT AAT GCC	1824
Ala Lys Ala Ile Tyr Gly Ala Ala Lys Leu Phe Leu Phe Asn Asn Ala	
1230 1235 1240 1245	
ACA GGC ATA TCA GTC AAA GCC AGC TTA AAA ATT TGG AAA ATG AAA GAG	1872
Thr Gly Ile Ser Val Lys Ala Ser Leu Lys Ile Trp Lys Met Lys Glu	
1250 1255 1260	
GCT CAG TTG GAC CCG TTT CCA TTA AGC GGC TGG TCT AGC	1911
Ala Gln Leu Asp Pro Phe Pro Leu Ser Gly Trp Ser Ser	
1265 1270	

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 4:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 637 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 4:

Met Ala Ser Ser Thr Thr Thr Pro Leu Leu Pro His His His Leu Gln	
1 5 10 15	
Asn Pro Gln Gln Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ala His Arg Leu Ser Arg	
20 25 30	
Pro Thr Leu Leu Ser Gly Ile Leu Val Ser Val Leu Val Ile Cys Ala	
35 40 45	
Leu Val Ala Val Ile His Asn Gln Ser Gln Gln Pro Tyr His Asp Gly	
50 55 60	
Gly Ala Lys Pro Ser Ser Ser Ala Ala Thr Thr Thr Phe Pro Thr Ala	
65 70 75 80	

Ser	Pro	Glu	Ala	Gly	Leu	Lys	Arg	Phe	Pro	Ile	Glu	Leu	Lys	Thr	Asn	
				85					90					95		
Ala	Glu	Val	Glu	Trp	Gln	Arg	Ser	Ala	Tyr	His	Phe	Gln	Pro	Asp	Lys	
			100					105					110			
Asn	Tyr	Ile	Ser	Asp	Pro	Asp	Gly	Pro	Met	Tyr	His	Met	Gly	Trp	Tyr	
		115					120					125				
His	Leu	Phe	Tyr	Gln	Tyr	Asn	Pro	Glu	Ser	Ala	Ile	Trp	Gly	Asn	Ile	
	130					135					140					
Thr	Trp	Gly	His	Ser	Val	Ser	Lys	Asp	Met	Ile	Asn	Trp	Phe	His	Leu	
145					150					155					160	
Pro	Phe	Ala	Met	Val	Pro	Asp	Gln	Trp	Tyr	Asp	Ile	Glu	Gly	Val	Met	
			165						170					175		
Thr	Gly	Ser	Ala	Thr	Val	Leu	Pro	Asp	Gly	Gln	Ile	Ile	Met	Leu	Tyr	
			180					185					190			
Thr	Gly	Asn	Ala	Tyr	Asp	Leu	Ser	Gln	Leu	Gln	Cys	Leu	Ala	Tyr	Ala	
		195					200					205				
Val	Asn	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Leu	Leu	Asp	Trp	Lys	Lys	Tyr	Glu	Gly	
	210					215					220					
Asn	Pro	Ile	Leu	Phe	Pro	Pro	Pro	Gly	Val	Gly	Tyr	Lys	Asp	Phe	Arg	
225					230					235					240	
Asp	Pro	Ser	Thr	Leu	Trp	Leu	Gly	Pro	Asp	Gly	Glu	Tyr	Arg	Met	Val	
				245					250					255		
Met	Gly	Ser	Lys	His	Asn	Glu	Thr	Ile	Gly	Cys	Ala	Leu	Ile	Tyr	His	
			260					265					270			
Thr	Thr	Asn	Phe	Thr	His	Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Glu	Val	Leu	His	Ala	
		275					280					285				
Val	Pro	His	Thr	Gly	Met	Trp	Glu	Cys	Val	Asp	Leu	Tyr	Pro	Val	Ser	
	290					295					300					
Thr	Thr	His	Thr	Asn	Gly	Leu	Asp	Met	Val	Asp	Asn	Gly	Pro	Asn	Val	
305					310					315					320	
Lys	His	Val	Leu	Lys	Gln	Ser	Gly	Asp	Glu	Asp	Arg	His	Asp	Trp	Tyr	
				325					330					335		
Ala	Leu	Gly	Thr	Tyr	Asp	Val	Val	Asn	Asp	Lys	Trp	Tyr	Pro	Asp	Asp	
			340					345					350			

Pro Glu Asn Asp Val Gly Ile Gly Leu Arg Tyr Asp Phe Gly Lys Phe
 355 360 365
 Tyr Ala Ser Lys Thr Phe Tyr Asp Gln His Lys Lys Arg Arg Val Leu
 370 375 380
 Trp Gly Tyr Val Gly Glu Thr Asp Pro Pro Lys Tyr Asp Val Tyr Lys
 385 390 395 400
 Gly Trp Ala Asn Ile Leu Asn Ile Pro Arg Thr Ile Val Leu Asp Thr
 405 410 415
 Lys Thr Asn Thr Asn Leu Ile Gln Trp Pro Ile Ala Glu Val Glu Asn
 420 425 430
 Leu Arg Ser Asn Lys Tyr Asn Glu Phe Lys Asp Val Glu Leu Lys Pro
 435 440 445
 Gly Ser Leu Ile Pro Leu Glu Ile Gly Thr Ala Thr Gln Leu Asp Ile
 450 455 460
 Thr Ala Thr Phe Glu Val Asp Gln Thr Met Leu Glu Ser Thr Leu Glu
 465 470 475 480
 Ala Asp Val Leu Phe Asn Cys Thr Thr Ser Glu Gly Ser Ala Gly Arg
 485 490 495
 Gly Val Leu Gly Pro Phe Gly Leu Val Val Leu Ala Asp Ala Glu Arg
 500 505 510
 Ser Glu Gln Leu Pro Val Tyr Phe Tyr Ile Ala Lys Asp Thr Asp Gly
 515 520 525
 Ser Ser Lys Thr Tyr Phe Cys Ala Asp Glu Ser Arg Ser Ser Asn Asp
 530 535 540
 Val Asp Ile Gly Lys Trp Val Tyr Gly Ser Ser Val Pro Val Leu Glu
 545 550 555 560
 Gly Glu Lys Phe Asn Met Arg Leu Leu Val Asp His Ser Ile Val Glu
 565 570 575
 Gly Phe Ala Gln Gly Gly Arg Thr Val Val Thr Ser Arg Val Tyr Pro
 580 585 590
 Ala Lys Ala Ile Tyr Gly Ala Ala Lys Leu Phe Leu Phe Asn Asn Ala
 595 600 605
 Thr Gly Ile Ser Val Lys Ala Ser Leu Lys Ile Trp Lys Met Lys Glu
 610 615 620

23.09.99

34

Ala	Gln	Leu	Asp	Pro	Phe	Pro	Leu	Ser	Gly	Trp	Ser	Ser
625					630					635		

23.09.99

PV 8110-99

63910

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Molekula nukleové kyseliny kódující sacharózofruktosyltransferázu závislou na sacharóze (SST), která je vybrána ze skupiny obsahující :
 - a) molekuly nukleové kyseliny kódující protein, který obsahuje aminokyselinovou sekvenci uvedenou jako sekvenci identifikačního čísla 2 a 4,
 - b) molekuly nukleové kyseliny, které obsahují nukleotidovou sekvenci uvedenou jako sekvenci identifikačního čísla 1 nebo odpovídající ribonukleotidovou sekvenci,
 - c) molekuly nukleové kyseliny, které obsahují nukleotidovou sekvenci uvedenou jako sekvenci identifikačního čísla 3 nebo odpovídající ribonukleotidovou sekvenci, a
 - d) molekuly nukleové kyseliny, které obsahují fragment molekul nukleové kyseliny uvedených v a) až c) kódující protein, který je schopen katalyzovat vytvoření β -2,1-glykosidických nebo β -2,6-glykosidických vazeb mezi fruktózovými jednotkami.
2. Molekula nukleové kyseliny podle nároku 1, která je molekula DNA.
3. Molekula DNA podle nároku 2, která je molekula cDNA.
4. Molekula nukleové kyseliny podle nároku 1, která je molekula RNA.
5. Vektor, který obsahuje molekulu nukleové kyseliny podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4.

6. Vektor podle nároku 5, kde molekula nukleové kyseliny je operativně spojena s regulačním prvkem, který dovolu je transkripci a syntézu translatovatelné RNA v prokaryotických a/nebo eukaryotických buňkách.

7. Vektor podle nároku 6, kde regulační prvek je odvozen z patatinového promotoru B33.

8. Hostitelská buňka, která je transformovaná molekulou nukleové kyseliny podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4 nebo vektorem podle kteréhokoliv z nároků 6 nebo 7, nebo buňka, která pochází z takové buňky.

9. Způsob přípravy SST vyznačující se tím, že hostitelská buňka podle nároku 8 se kultivuje v podmínkách, které dovolují syntézu SST a SST se izoluje z kultivovaných buněk a/nebo kultivačního média.

10. SST, která je kódována molekulou nukleové kyseliny podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, nebo která je připravena způsobem podle nároku 9.

11. Transgenní rostlinná buňka, která je transformovaná molekulou nukleové kyseliny podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4 nebo vektorem podle kteréhokoliv z nároků 6 nebo 7, nebo která pochází z takové buňky, přičemž molekula nukleové kyseliny kódující SST z artyčoku je řízena regulačním prvkem, který umožňuje transkripci translatovatelné RNA v rostlinných buňkách.

12. Rostlina, která obsahuje rostlinné buňky podle nároku 11.

13. Rostlina podle nároku 12, která je užitkovou rostlinou.
14. Rostlina podle nároku 13, která je rostlinou akumulující sacharózu nebo rostlinou akumulující škrob.
15. Rostlina podle nároku 15, kterou je rostlina bramboru.
16. Rostlinný rozmnožovací materiál z rostliny podle kteréhokoliv z nároků 12 až 15, který obsahuje rostlinné buňky podle nároku 11.
17. Sklizňové produkty z rostlin podle kteréhokoliv z nároků 12 až 15, které obsahují rostlinné buňky podle nároku 11.
18. Způsob přípravy fruktosylových polymerů s krátkým řetězcem v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje
- a) kultivaci hostitelské buňky podle nároku 8 nebo rostlinné buňky podle nároku 11 v podmínkách, které dovolují produkci SST a konverzi, pokud je to třeba, externě přidané sacharózy nebo ekvivalentního substrátu na fruktosylové polymery s krátkým řetězcem, a
 - b) získání tímto způsobem tvořených fruktosylových polymerů z kultivovaných buněk nebo média.
19. Způsob přípravy fruktosylových polymerů s krátkým řetězcem v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje
- a) působení SST podle nároku 10 na sacharózu nebo ekvivalentní substrát v podmínkách dovolujících konverzi na fruktosylové polymery s krátkým řetězcem, a
 - b) získání takto tvořených fruktosylových polymerů.

20. Způsob přípravy fruktosylových polymerů s krátkým řetězcem
v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje

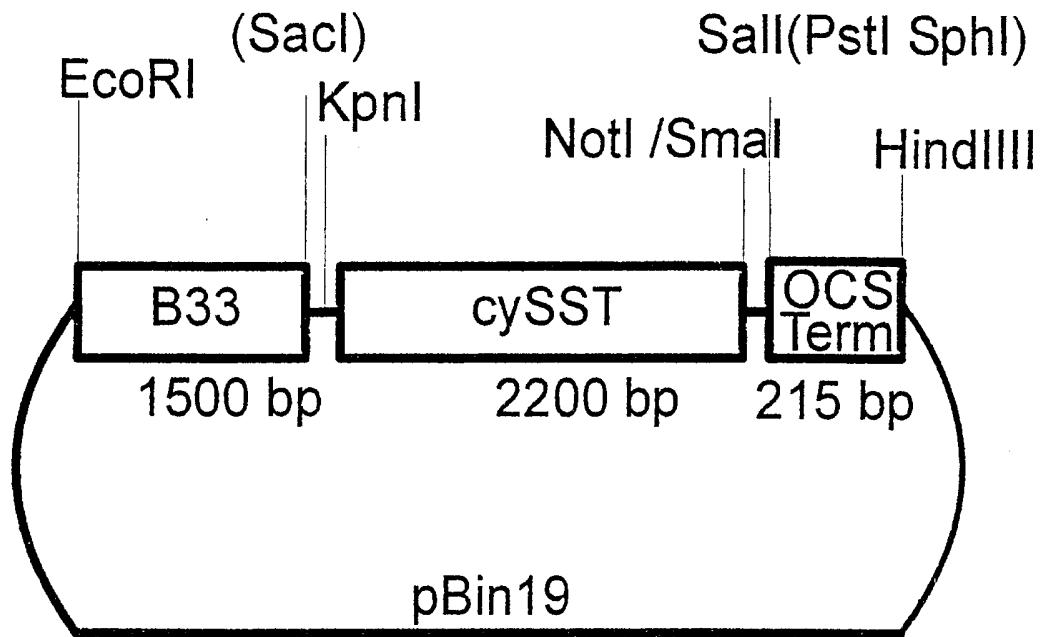
- a) kultivaci rostliny podle kteréhokoliv z nároků 12 až 15, a
- b) získání fruktosylových polymerů z těchto rostlin nebo jejich
rozmnožovacího materiálu podle nároku 16 nebo ze sklizňových
produktů podle nároku 17.

23.09.99

IV 890-99

659/6

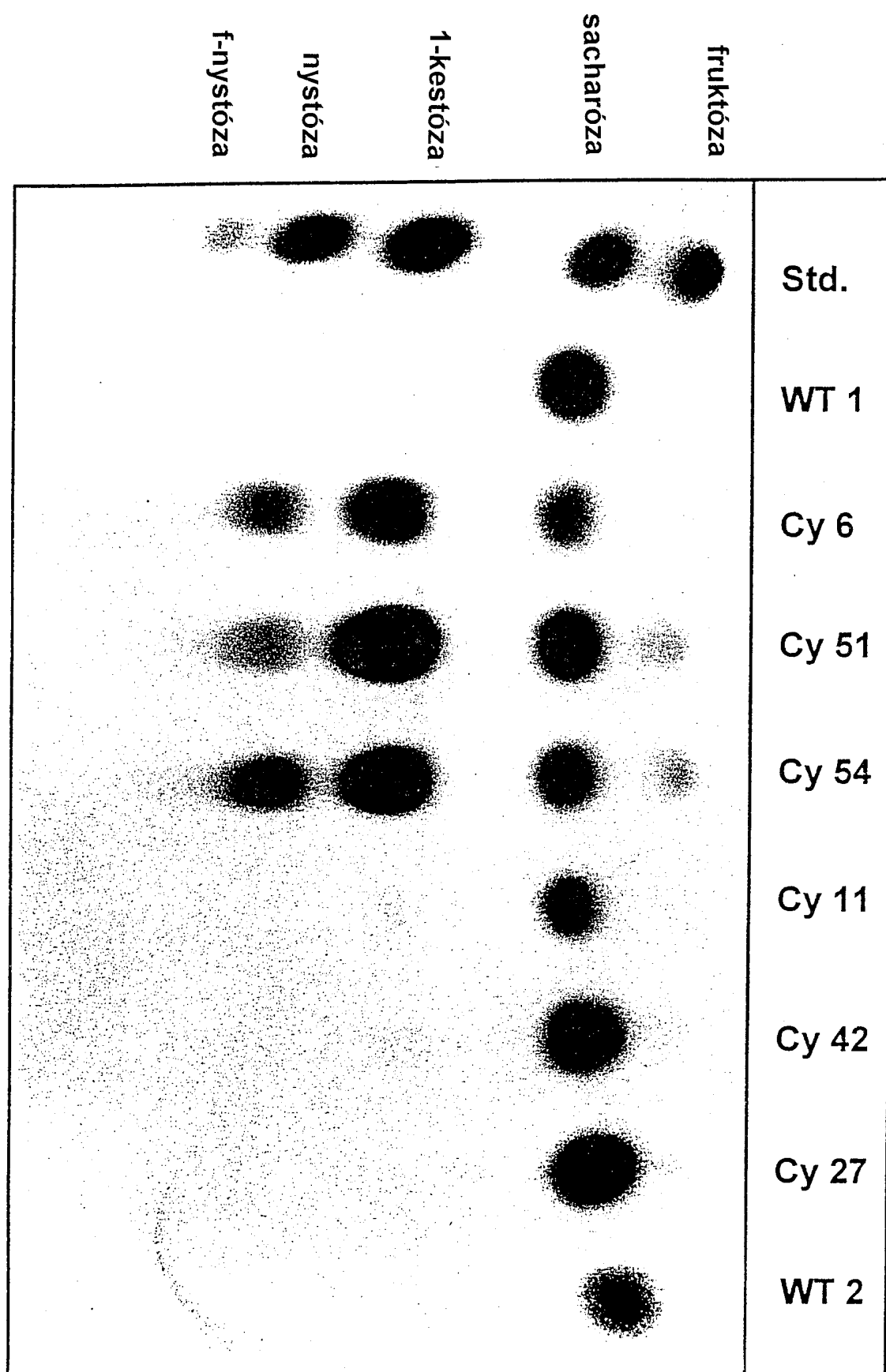
1/4



Obr. 1

23.09.99

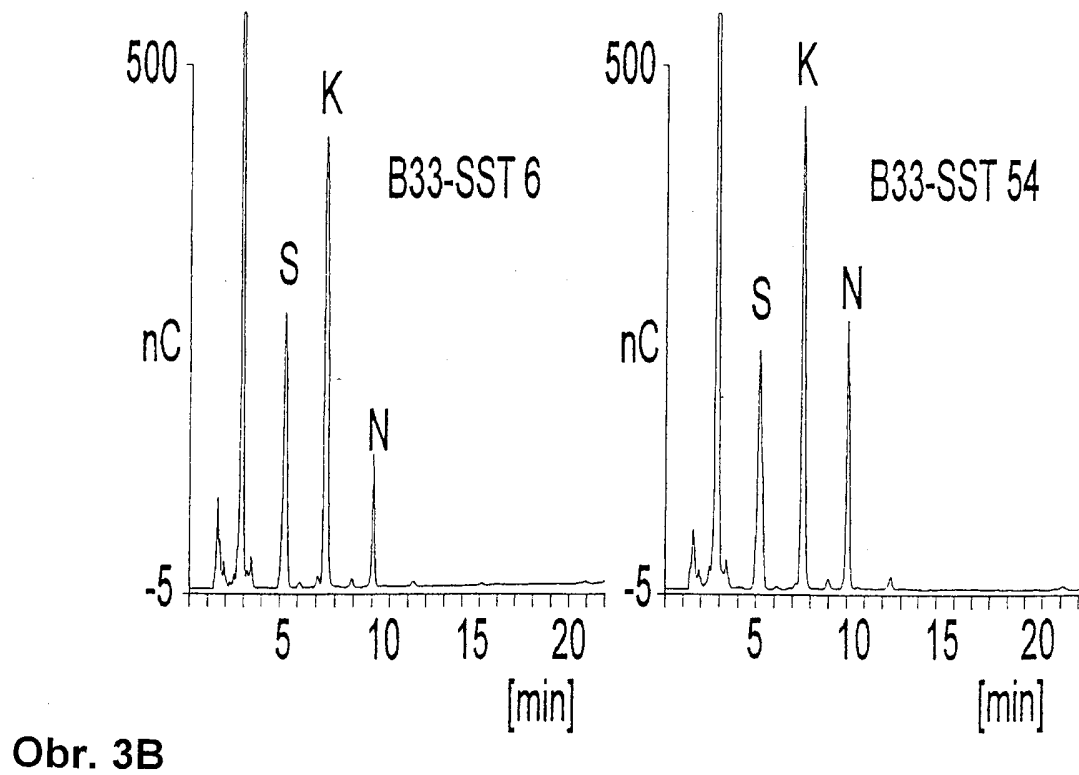
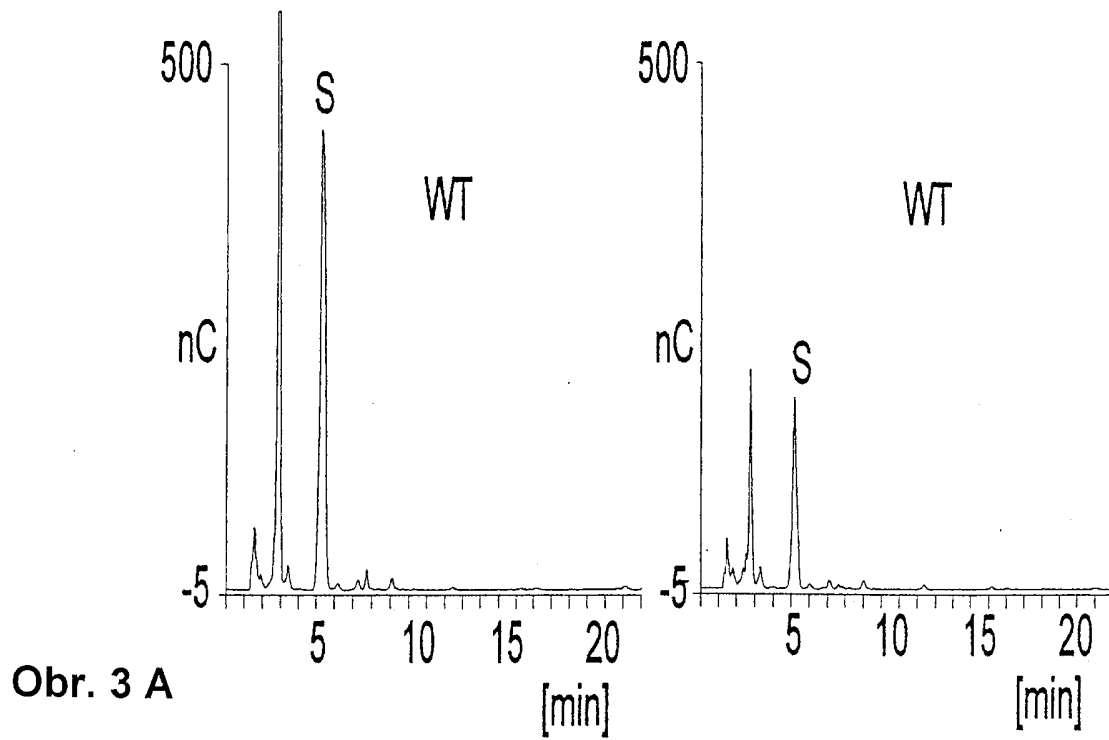
2/4



Obr. 2

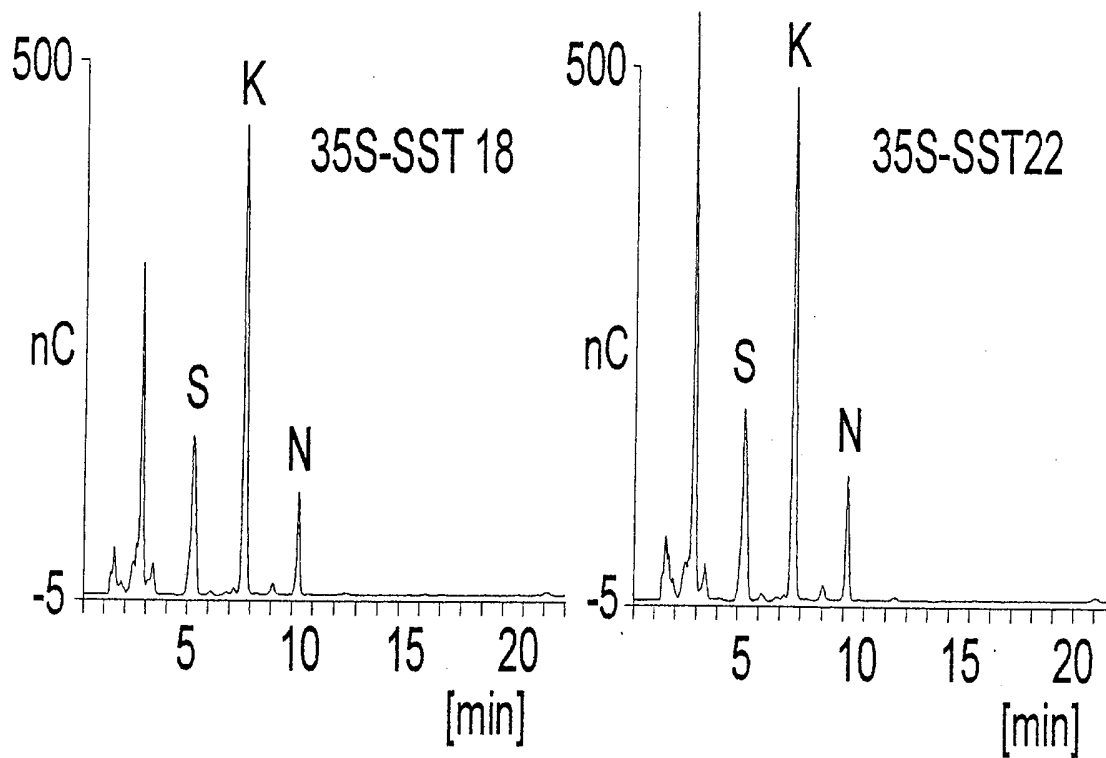
23.09.99

3/4



23.09.99

4/4



Obr. 3C