

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 17.07.2001
(32) Datum podání prioritní přihlášky: 17.07.2000
(31) Číslo prioritní přihlášky: 2000/218765
(33) Země priority: US
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 13.08.2003
(Věstník č. 8/2003)
(86) PCT číslo: PCT/CA01/01028
(87) PCT číslo zveřejnění: WO02/012551

(21) Číslo dokumentu:

2003 - 146

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 Q 1/68

(71) Přihlašovatel:

HER MAJESTY THE QUEEN IN RIGHT OF
CANADA AS REPRESENTED BY THE MINISTER
OF AGRICULTURE AND AGRI-FOOD, Sainte-Foy,
CA;
DNA LANDMARKS INC., St.-Jean-sur-Richelieu, CA;

(72) Původce:

Castonguay Yves, Sainte-Foy, CA;
O'Donoghue Louise S., Mont St. Hilaire, CA;
Landry Benoit S., L'Acadie, CA;
Laberge Serge, Siliery, CA;
Monroy Antonio F., Montréal, CA;
Vezina Louis P., Neuville, CA;

(74) Zástupce:

Matušková Martina Mgr., Mendlovo nám. 1a, Brno,
60300;

(54) Název přihlášky vynálezu:

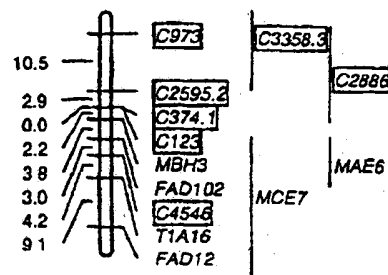
**Způsob identifikace regulačního místa
kontrolujícího úroveň genových prepisů a
produktů založená na mapování**

(57) Anotace:

Je popsán způsob identifikace jedné nebo více oblastí v genomu zkoumaného organismu, která zprostředkovává expresi jednoho nebo více zkoumaných genů. Způsob zahrnuje identifikaci prvního a druhého zkoumaného organismu, první zkoumaný organismus je charakteristický tím, že vykazuje měřitelnou odpověď na podnět prostředí, nebo jinak vykazuje fenotyp asociovaný se změněnou genovou expresí související se zkoumaným procesem. Druhý zkoumaný organismus je charakteristický tím, že nevykazuje žádnou nebo tak silnou odpověď na podnět, jako tomu bylo u prvního zkoumaného organismu, nebo vykazuje rozdílný fenotyp ve srovnání s fenotypem prvního zkoumaného organismu, kde je tento odlišný fenotyp asociován se zkoumaným procesem, nebo vykazuje fenotyp, který se segreguje ve srovnání s prvním zkoumaným organismem,

nebo vykazuje jejich kombinaci. První a druhý zkoumaný organismus jsou kříženy s cílem získat populaci segregujícího potomstva a z každého segregujícího potomka je izolována RNA. Je kvantifikována hladina genové exprese jednoho nebo více zkoumaných genů, které jsou asociované s odpovědí na podnět prostředí nebo se zkoumaným procesem. Je připravena mapa vazeb segregujícího se potomstva s použitím jednoho nebo více markerů a je určen vztah mezi jedním nebo více uvedenými markery na mapě vazeb a genovou expresí jednoho nebo více zkoumaných genů a je identifikován jeden nebo více lokusů kvantitativního znaku (QTL). Tento způsob se také hodí k identifikování jednoho nebo více QTL lokusů asociovaných s jedním nebo více zkoumanými geny v segregujícím potomstvu, které je vystaveno požadovanému podnětu prostředí. Dále lze tento způsob použít pro identifikaci jednoho nebo více QTL lokusů odpovídajícímu transkripčnímu faktoru nebo jakémukoli faktoru řídícímu expresi jednoho nebo více zkoumaných genů, tento jeden nebo více genů nacházejících se v jednom nebo více QTL lokusech může být identifikován a charakterizován.

A



Způsob identifikace regulačního místa kontrolujícího úroveň genových prepisů a produktů založená na mapování

Oblas techniky

Vynález se týká způsobu sloužící k identifikaci regulačního lokusu, které řídí expresi genu v jakémkoli organismu. Konkrétněji se vynález týká použití mRNA transkriptů a rozdílů v hladinách transkriptů pro identifikaci lokusu kvantitativního znaku, který odpovídá požadované vlastnosti daného organismu.

Dosavadní stav techniky

Volba požadovaných rostlinných znaků je v šlechtitelských programech obvykle založena na výběru jednoho nebo více fenotypových znaků. Nicméně, mnoho významných agronomických vlastností je komplexních, do značné míry ovlivnitelných prostředím a jsou řízeny polygenně, kdy určitý fenotypový znak je řízen množstvím genů spíše než jedním řídícím lokusem. U znaků řízených polygenně nebo multigenně může exprese alel z více lokusů přispívat k požadovanému fenotypu.

Opakovaně bylo ukázáno, že mnoho genů není exprimováno jako odpověď na vývojové podněty nebo podněty životního prostředí. Pochopení faktorů, které řídí expresi těchto genů je zvláště důležité u transgenních organismů, například po vnesení cizího genu, pro řízení úrovně jeho transkripce v závislosti na vývojovém stádiu, tkáni nebo stresových faktorech. Tyto výzkumy odhalují komplexitu a redundanci řízení na několika úrovních které se uplatňuje při expresi genů. Mechanismy řízení genové exprese se mohou u jednotlivých genů značně lišit (viz např. Hirt. H. 1999 Trends Plant Sci. 4: 7-8). Pod vlivem souboru určitých vývojových podmínek nebo podmínek prostředí, geny zapojené do určitého procesu neodpovídají vždy podobným způsobem, ani se neakumulují ve stejném typu buněk nebo tkání, což naznačuje, že jsou řízeny jinými kontrolními nebo signálními mechanismy.

S použitím současných metod je složité vyhledat klíčové regulační geny, které řídí expresi požadovaných genů v celé kaskádě dějů. Rozdílně exprimované geny byly identifikovány s použitím různých přístupů, jako např. diferenciální screening knihoven cDNA, sekvenování genomu kombinované s hledáním homologů v genových bankách, genový knock-out a komplementace, mutace homeotických genů, vysoce účinný screening EST tagů s použitím genových čipů. Tyto přístupy i přes svoji pracnost jsou příležitostně pro identifikaci genů zahrnutých v řízení genové exprese použitelné, identifikaci ale nejsou pro tento účel speciálně vytvořeny. Metody genového „knock-outu“ (mutační varianty) jsou



vhodné pro identifikaci faktorů řídících genovou expresi u druhů s malým genomem, jako např. *Arabidopsis*. Tyto techniky jsou také pracné, nespecifické a často vedou k nedetekovatelným nebo letálním fenotypům. Kombinování metod, jako je diferenční display druhů mRNA, subtrakční nebo normalizované knihovny a genové čipy mohou být použity pro vybrané regulační geny. Nicméně tyto metody nejsou specifické při analýze exprese jediného genu a jsou náročné na čas. Navíc, transkripty požadovaných regulačních genů musí být u těchto metod přítomny ve vzorcích použitých k vytváření knihoven, aby mohli být tyto transkripty identifikovány. Tento úkol může přesahovat rámec možností v případě, kdy zahrneme násobně regulované geny s nesynchronizovanou expresí.

Lokus kvantitativního znaku (QTL) je úsek genomu, který kóduje jeden nebo více proteinů a to vysvětluje významnou část variability daného fenotypu, který může být řízen množstvím genů. Obvykle se k identifikaci požadovaného QTL používá jeden nebo více genetických markerů. Dodnes se většina výzkumů QTL lokusů zabývala hrubými morfologickými a agronomickými fenotypy (např. výtežností, odolností vůči nemocem a stresům, obdobím květu atd.). Například ve WO 2000/18963 je popsána asociace rostlin sóji obsahující QTL se zvýšenou výnosností, a dále metody pro výběr a šlechtění těchto rostlin. Tato metoda obsahovala použití specifické markerové nukleové kyseliny schopné hybridizace s druhou molekulou nukleové kyseliny, která je přítomna ve specifické oblasti u *Glycine soja* a která je spojena se zvýšenou výnosností. V patentu US 5 948 953 byla popsána asociace QTL u rostlin sóji a odolnosti vůči hnědé hnilobě stonku (BSR). QTL lokus mající spojitost s rezistencí vůči BSR může být použit pro selekci rostlin s využitím selekce pomocí markeru (marker assisted selection). WO 99/31964 popisuje pro selekci rostlin použití markerové nukleové kyseliny, která vykazuje genetickou vazbu se souborem 63 specifických lokusů. Nalezené polymorfismy mohou být použity při mapování DNA způsobem „DNA fingerprintingu“ a při mapování genů nebo QTL lokusů asociovaných s odolností vůči škůdcům nebo chorobám. Několik posledních QTL studií se zabývalo vztahem jejich kvantitativních variací specifických metabolických změn zahrnujících hromadění metabolitů nebo změny v enzymových aktivitách. Například Byrne a kol. (Byrne, P.F., McCulen, M.D., Snook, M. E., Musket, T.A., Theuri, J.M., Widstrom, N.W., Wiseman, B.R. a E.H. Coe. 1996. Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 8820-8825) popisuje mapování evidence QTL pro 58 % rozdílných koncentrací maysinu, což je flavon, který hraje úlohu rostlinného faktoru resistance (host plant resistance) vůči kukuřičným červům, a lokusem kódujícím transkripční aktivátor pro část metabolické dráhy flavonoidů. Prioul a kol. (Prioul, J.-L., Quarrie, S., Causse, M. a D. de Vienne. 1997 J. Exp. Bot. 48: 1151-1163; Prioul, J.-L., Pelleschi, S., Séne M., Thévenot, C.,



Causse, M., de Vienne, D. a A. Leonardi. 1999. *J.Exp. Bot.* 50: 1281-1288) použili enzymové aktivity, hladiny substrátů a produktů známé biosyntetické dráhy, jako kvantitativní znaky v analýzách QTL. Podobně Pelleschi a kol. (Pelleschi, S., Guy, S., Kim, J.-Y., Pointe, C., Mahé, A., Barthes, L., Leonardi, A., a J.-L. Prioul. 1999. *Plant Mol. Biol.* 39: 373-380) zahrnuje použití aktivity invertázy jako znaku pro identifikaci kandidátských genů pro QTL lokusy asociované s odchylkami v aktivitě invertázy u kukuřice. Damerval a kol. (Damerval C., Maurice, A., Josse, J.M. a D. de Vienne. 1994. *Genetics* 137: 289-201) zahrnuje použití peptidů na 2D-gelu jako kvantitativního znaku pro mapování QTL.

Žádný z uvedených přístupů nedemonstruje ani nenaznačuje, že metodu mapování QTL lze použít k identifikaci genů podílejících se na regulaci exprese jednoho genu nebo kaskády genů, ani nedoporučují použití mRNA transkriptů jako fenotypických znaků pro mapování QTL.

Dumas a kol. (Dumas P., Sun Y., Corbeil G., Tremblay S., Pausova Z., Kren V., Krenova D., Pravenec M., Hamet P., a J. Tremblay 2000, *J. Hypertens* 18: 545-551) zahrnuje použití mRNA jako fenotypového markeru při mapování QTL asociovaného s expresí stresového genu u krysy. Podobný přístup používající diferenční genovou expresi při mapování QTL asociovaného s krevním tlakem u krys navrhli Cicila a Lee (Cicila G.T. a S.J. Lee 1998, *Hypertens. Res.* 21: 289-296). Žádná z těchto prací nenavrhuje QTL přístup pro identifikaci genů, které hrají úlohu při regulaci samostatných genů nebo v komplexní regulační kaskádě odpovědné za řízení transkripčních úrovní. Navíc se zde nediskutuje o QTL mapování diferenční genové exprese v organismech, které jsou charakteristické ploidií větší, než je diploid. Ani se zde nediskutuje o identifikaci QTL asociovaných s diferenční genovou expresí u neživočišných hostitelů.

Vynález se zaměřuje na identifikaci genotypových oblastí, které jsou zapojené do genetické regulace exprese jednoho nebo více zkoumaných genů spojených s požadovanými znaky/vlastnostmi. Použitím analýz genomu založených na mapování QTL jsou identifikovány lokusy pro regulační geny asociované s diferenční akumulací transkriptů nebo genových produktů.

Cíl vynálezu je překonání dosavadních nedostatků v tomto oboru.

Tento cíl je naplněn kombinací rysů hlavních nároků, závislé nároky představují další výhodná provedení podle vynálezu.



Podstata vynálezu

Vynález se vztahuje k použití mRNA transkriptů, a změn v hladinách transkriptů pro identifikaci lokusu kvantitativního znaku, který náleží určitému požadovanému znaku organismu. Konkrétně se vynález zabývá způsobem identifikující lokusy regulačních genů, které řídí genovou expresi pro daný znak v kterémkoli organismu. Konečně, se vynález zabývá způsobem identifikace genů a genových sekvencí, které regulují expresi genů, a regulačních kaskád řídících expresní znaky v rámci organismu.

Podle vynálezu je zde poskytnut způsob identifikace jednoho nebo více oblastí v genomu zkoumaného organismu, které zprostředkují expresi jednoho nebo více zkoumaných genů, která obsahuje:

- i) identifikaci prvního zkoumaného organismu, který je charakteristický tím, že tento první zkoumaný organismus vykazuje měřitelné odpovědi na podněty z prostředí, nebo jinak vykazuje fenotyp asociovaný s diferenční genovou expresí spojenou se zkoumaným procesem;
- ii) identifikaci druhého zkoumaného organismu charakteristického tím, že druhý zkoumaný organismus:
 - a. postrádá nebo nevykazuje tak silnou odpověď na podněty, jako tomu bylo u prvního zkoumaného organismu;
 - b. vykazuje rozdílný fenotyp ve srovnání s fenotypem prvního zkoumaného organismu, tento rozdílný fenotyp souvisí se zkoumaným procesem;
 - c. vykazuje zkoumaný fenotyp, který je v populaci segregován jako následek křížení s prvním zkoumaným organismem;
 - d. nebo je kombinací dvou nebo více z a), b) c) a d);
- iii) křížení prvního a druhého zkoumaného organismu s cílem vyprodukovat populaci segregujícího potomstva;
- iv) vyjmutí RNA z každého segregujícího potomstva a kvantifikace hladiny genové exprese jednoho nebo více zkoumaných genů, kdy jeden nebo více těchto zkoumaných genů je asociovaných s odpovědí na podněty prostředí, nebo se zkoumaným procesem;
- v) příprava mapy genových vazeb u segregujících populací s použitím jednoho nebo více markerů;
- vi) určení vztahu mezi jedním nebo více markery na mapě genových vazeb a genové exprese jednoho nebo více zkoumaných genů a identifikaci jednoho nebo více lokusů kvantitativních znaků (QTL).



Vynález také zahrnuje způsob definovaný výše, kde po kroku křížení (krok iii)), a před krokem extrahování RNA, je segregující potomstvo vystaveno požadovaným podnětům vnějšího prostředí nebo je charakterizováno tak, jako by se právě nacházelo v specifické vývojové fázi.

Způsob podle vynálezu tak, jak zde byla popsán, může být použit k identifikaci jednoho nebo více QTL shodujících se s transkripčními faktory nebo kterýmikoli faktory řídícími expresi jednoho nebo více zkoumaných genů.

Dále se vynález zabývá popsáním způsobem, kde po kroku determinace vztahů (krok vi)), je izolován charakterizován jeden nebo více genů umístěných na jednom nebo více QTL lokusech.

Vynález je také veden an způsob, který zde byl popsán, kde v kroku determinace vztahů (krok vi)), je marker identifikován v QTL.

Dále může být tento marker použit pro:

- vyhledání potomstva určitého organismu;
- určení hybridnosti/křížení organismu;
- identifikaci odchylky vázaného fenotypového znaku, expresního znaku nebo obou,

jak fenotypového znaku, tak expresního znaku;

- konstrukci genetické mapy;
- identifikaci individuálního potomstva z křížení;
- izolaci sekvence genomové DNA obklopující DNA sekvenci kódující gen nebo

nekódující DNA sekvenci;

- selekci založenou na markeru (marker assisted selection), klonování založené na mapování/mapě, potvrzení hybridů, určení fingerprintingu, určení genotypu, jako marker specifický pro alelu, nebo kombinace těchto uplatnění.

Vynález také zahrnuje způsob (B) identifikace regulačního genu, který zprostředkuje expresi zkoumaného genu obsahující:

- i) identifikaci jednoho nebo více lokusů kvantitativního znaku (QTL), které vysvětlují podstatnou část odchylek v expresi jednoho nebo více zkoumaných genů;
- ii) mapování jednoho nebo více těchto regulačních genů;
- iii) určení, zda tento jeden nebo více regulačních genů je umístěn do jednoho nebo více QTL lokusů;
- iv) izolování jednoho nebo více regulačních genů v rámci tohoto jednoho nebo více QTL;

v) sekvenování tohoto jednoho nebo více regulačních genů izolovaných v kroku iv).

Vynález také zahrnuje způsob zprostředkování odpovědi zkoumaného organismu na podnět prostředí skládající se z: transformace zkoumaného organismu pomocí regulačního genu identifikovaného způsobem (B), který zde byl popsán.

Dále se vynález zabývá způsobem zprostředkujícím vývoj zkoumaného organismu, který sestává z transformace zkoumaného organismu regulačním genem, který byl identifikován s použitím způsobu (B), který zde byl popsán.

Vynález také zahrnuje způsob (C) sloužící k identifikaci regulační sekvence, která zprostředkuje expresi zkoumaného genu obsahující:

- i) identifikaci jednoho nebo více lokusů kvantitativního znaku (QTL), které vysvětlují podstatnou část odchylek v expresi jednoho nebo více zkoumaných genů;
- ii) mapování tohoto jednoho nebo těchto více regulačních genů;
- iii) určení, zda tento jeden nebo více regulačních genů je umístěno uvnitř jednoho nebo více těchto QTL;
- iv) izolování jednoho nebo více regulačních genů umístěných v jednom nebo více těchto QTL; a
- v) sekvenování regulační sekvence tohoto jednoho nebo těchto více regulačních genů izolovaných v kroku iv).

Vynález se týká způsobu, který zprostředkuje odpověď zkoumaného organismu na podněty prostředí zahrnující: transformaci zkoumaného organismu regulační sekvencí napojené (fused) na požadovaný gen, kde regulační sekvence byla identifikována pomocí způsobu (C) tak, jak zde byla popsána.

Dále tento vynález zahrnuje způsob zprostředkující vývoj zkoumaného organismu sestávající z: transformace zkoumaného organismu regulační sekvencí napojené na požadovaný gen, kde regulační sekvence byla identifikována pomocí způsobu (C) tak, jak zde byl popsán.

Způsob umožňuje identifikaci genů, které sdílejí společný regulační lokus nebo které podléhají stejné regulaci. To může mít důležité důsledky pro mnoho podávaných přihlášek, například, ale ne pouze, na selekci založenou na makeru (marker assisted selection), určování fenotypu, kaskádové analýzy mapovací metabolických cest, interakce genové regulace, analýzu genového toku (gene flux analysis), atd.

Genomové regiony asociované s úrovní exprese genů mohou být identifikovány s pomocí mapovacích analýz QTL. Tento přístup, používající úroveň exprese genu jako

kvantitativního znaku, zužuje výběr takových regulačních genů a sekvencí na specifické genomové oblasti a tak umožňuje identifikaci mechanismů řízení genové exprese. Takto identifikované významné QTL a také neočekávaně vysoká úroveň odchylek, kterou vysvětlují, ukazuje možnosti použití QTL analýz genové exprese při lokalizování důležitých regulačních faktorů zodpovědných za genovou expresi vyvolanou stresem. Srovnávací analýzy QTL u násobných genů spouštěných stejným vnějším podnětem dále dovolují objasnění komplexních pochodů regulujících genovou expresi a umožňují nové seřazení genů (regroup), které sdílí regulační faktory.

Způsoby podle vynálezu lze aplikovat na zkoumané geny, jejichž exprese je regulovaná jakýmkoliv faktory s použitím segregujících populací na základě hladin exprese těchto genů. To umožní identifikaci genomových oblastí. Pokud jsou jednou identifikovány, mohou být tyto genomové oblasti použity k charakterizování daného genotypu, bez vnějších nebo vývojových zásahů, které jsou vlastní metodám založeným na genové expresi.

Určením jednoho nebo více QTL pro polygenní znaky, které jsou vyvolané podněty prostředí (například, ale ne pouze, teplotní stres) nebo takové znaky, které souvisí s daným procesem (například, ale ne pouze, míra výtěžnosti), způsoby podle vynálezu mohou také identifikovat jeden nebo více QTL, který obvykle souvisí se zkoumaným fenotypovým znakem a expresí genů s důležitou adaptivní hodnotou pro daný znak. Regulační geny a regulační sekvence nalezené uvnitř těchto lokusů budou mít pravděpodobně velký význam pro zlepšení polygenního znaku.

Rozumí se, že způsob podle vynálezu je použitelná u jakéhokoli hostitelského organismu, nicméně existuje několik organismů, například, ale ne pouze, jednobuněčné organismy nebo rostliny, které poskytují jedinečné výhody oproti jiným eukaryotním systémům, s ohledem na použití způsobu podle vynálezu. Například, u některých rostlinných druhů, generace dvojitých haploidů z pylu, v nichž je každý lokus homozygotní, samoopylení (selfing) nebo zpětné křížení s jednou nebo další rodičovskou linií F1, za vzniku segregujících F2 nebo zpětně křížené populace, možnost opakovaně provádět samoopylení rostlinných jedinců F2 po několika generacích (F6 – F10) za vzniku série rekombinantních inbredních linií, možnost znásobit každý genotyp pomocí množení klonováním dovoluje mnohonásobnou destruktivní analýzu stejného genetického materiálu, a možnost podrobit geneticky identický materiál různým podnětům prostředí nebo dalším procesům. Dále tyto typy klonálních materiálů mohou být replikovány v různých podmínkách prostředí, kdy může být studován interakční účinek genotypu, prostředí, nebo genotypu i prostředí zároveň, na fenotyp.

Toto shrnutí vynálezu nepopisuje bezpodmínečně všechny nezbytné rysy podle vynálezu, ale vynález může také spočívat v dalším kombinování popsaných rysů vynálezu.

Vynález se zabývá způsobem identifikace regulačního lokusu, který řídí genovou expresi u všech organismů. Konkrétně se vynález vztahuje na použití mRNA transkriptů, a odchylek v množství těchto transkriptů pro identifikaci lokusu kvantitativního znaku, který souvisí s požadovanou vlastností u organismu.

Následující popis výhodného provedení podle vynálezu je uveden pouze prostřednictvím příkladu a není limitující na kombinaci znaků nezbytných pro praktické provedení vynálezu.

Lokus kvantitativního znaku (QTL) je taková oblast v genomu, která vysvětluje podstatnou část odchylek daného fenotypu, který je řízen prostřednictvím mnoha genů, například, ale není omezeno na znaky, které jsou spojené se zvýšenou produkcí, odolností vůči mrazu, odolností vůči suchu a jiné. Uvnitř těchto oblastí je umístěn jeden nebo více genů kódujících faktory, které mají podstatný vliv na fenotyp tohoto organismu.

Jak zde bylo popsáno, mapa vazeb zkonstruovaná s použitím jakéhokoli markeru, jako například markery založené na morfologických znacích, izoenzymech nebo DNA může být použita pro umístění každého zkoumaného genu do daného místa na mapě. Exprese samostatného zkoumaného genu je považována za kvantitativní znak. Aniž bychom chtěli být svazováni teorií, pokud jsou odchylky v expresi zkoumaného genu výsledkem odchylek v genu samotném, například jako důsledek různých alelických forem tohoto genu, pak by hlavní lokus kvantitativního znaku měl být umístěn v blízkosti umístění strukturního genu. Nicméně, jak je ukázáno dále, je pozorováno, že odchylky v expresi zkoumaného genu jsou do značné míry a podstatně vysvětleny QTL lokusy, které jsou umístěné kdekoliv v genomu (viz Obr. 1). Proto genomové oblasti vzdálené od zkoumaného genu řídí a regulují expresi zkoumaného genu. Tyto oblasti genomu mohou být identifikovány s použitím map vazeb a regulační geny kódující faktory, které řídí expresi zkoumaného genu, jsou potom identifikovány pomocí metod známých odborníkům v oblasti.

Termínem „zkoumaný gen“ je myšlen jeden nebo více známých genů, které mohou být použity jako kvantitativní znak charakterizovaný použitím způsobu podle vynálezu, a který může zahrnovat regulační oblasti umístěné proti směru i po směru exprese, introny a exony. Zkoumaný gen je obvykle, ale ne vždy, exprimován za podmínek používaných k určení účinku regulačních genů na expresi nebo supresi, tohoto zkoumaného genu. Úroveň exprese zkoumaného genu může být určena pomocí kterékoli metody používané v oboru, například analýzy využívající Northern blot, ochrany RNáz, čipové analýzy, PCR a podobně.

Zkoumaný gen nebo úroveň jeho transkriptů je kvantitativním znakem, který je použit pro další identifikaci jednoho nebo více QTL asociovaných s expresí zkoumaného genu. Jeden nebo více zkoumaných genů může být použito v rámci způsobu podle vynálezu pro analýzu odpovědi na podněty prostředí nebo analýzu dalších zkoumaných procesů, jak bylo definováno výše. Zvýšením počtu zkoumaných genů použitých v analýze je možné identifikovat jeden nebo více QTL, které jsou odpovědné za regulaci několika zkoumaných genů souvisejících s odpovědí na podnět prostředí nebo s jinými zkoumanými procesy u rostliny, pravděpodobně se tak vyzdvihne důležitost QTL lokusů. Takovýto přístup je zahrnut dále a v Příkladech provedení vynálezu.

Pojmem „regulační gen“ je myšlen gen, jehož produkt přímo nebo nepřímo ovlivňuje expresi zkoumaného genu a zahrnuje kódující oblast, nekódující a regulační oblasti umístěné proti směru (5') a po směru (3') přepisu a introny. Obvykle je regulační gen rozdílně exprimován jako reakce na podnět, například, ale ne pouze, na podněty prostředí, jako jsou tepelný šok nebo teplotní stres. Příklad regulačního genu zahrnuje, ale není na něj omezen, gen, který kóduje transkripční faktor, nebo gen kódující další proteinový faktor, který nějakým způsobem reguluje expresi dalšího genu. Produkt kódovaný regulačním genem může přímo ovlivňovat expresi zkoumaného genu, například, ale ne pouze, vázáním na regulační oblasti umístěné proti směru (5') nebo po směru (3') přepisu kódující oblasti zkoumaného genu, nebo uvnitř intronů, jak je známo v oboru a tak zvyšovat nebo tlumit expresi zkoumaného genu. Regulační gen může také kódovat produkt, který ovlivňuje buď stabilitu transkriptu zkoumaného genu, rychlost nebo stabilitu translace nebo transkriptu, který byl syntetizován podle zkoumaného genu, nebo jak posttranskripční tak posttranslační procesy spojené s expresí zkoumaného genu. Dále se také uvažuje, že regulační gen může ovlivňovat změny v expresi zkoumaného genu nepřímo tím, že zprostředkovává expresi jednoho nebo více sekundárních genů, jejichž produkty mohou interagovat s expresí zkoumaného genu. Také se uvažuje, že jeden nebo více regulačních genů může působit synergisticky za vzniku změny exprese zkoumaného genu.

Způsob podle vynálezu umožňuje identifikaci genů, které sdílejí společné regulační lokusy, nebo které podléhají stejné regulaci. Toto může mít nezanedbatelné důsledky pro mnohé aplikace, například, ale ne pouze, pro selekci s pomocí markeru (marker assisted selection), fenotypizace, kaskádové analýzy mapující metabolické dráhy, genové regulační interakce, analýzy genového toku, nebo identifikaci regulačních genů s významným vlivem na polygenní znaky.

Pojmem „podnět prostředí“ je myšlen jakýkoliv podnět působící a produkující měřitelné odpovědi uvnitř zkoumaného organismu. Například, ale ne pouze, zkoumaným organismem může být rostlina, rostlinný orgán, tkáň nebo buňka a podnětem prostředí může být například, ale ne pouze, biotický podnět zahrnující zamoření viry, bakteriemi, houbami, hmyzem, červy nebo jinými býložravci, nebo to může být abiotický podnět, například, ale ne pouze stres související s chladem, mrazem, vodou, suchem, osmotickým tlakem, horkem, solemi, oxidací nebo znečištěním. Podnět prostředí může také zahrnovat vlivy minerální výživy, světla, a endogenních nebo exogenních chemikálií na zkoumaný organismus nebo orgán, tkáň nebo jeho buňku.

Pojmem „zkoumaný proces“ se myslí jakýkoliv proces, který produkuje měřitelný účinek uvnitř zkoumaného organismu nebo orgánu, tkáně nebo jeho buňky, například, ale ne pouze, v rostlině. Zkoumaný proces může zahrnovat, ale není omezen na, vývojové, chemické nebo enviromentální řízení genové exprese v rámci, ale ne pouze v případě rostliny, embryogeneze, vývoje květu, semene, kořene nebo listu, organogeneze nebo v rámci cirkadiánních a ultradiánních a dalších vnitřních cyklů. Další zkoumané procesy mohou zahrnovat, ale nejsou omezeny na, výtěžek, který je možno sklídit, fotosyntetickou translokaci, místa spotřeby a zdrojů v rostlině, index listové plochy (leaf area index), poměr podzemních a nadzemních částí rostliny (root shoot ratio), výživnou hodnotu sklizeného materiálu, morfologii rostliny, rychlost buněčného cyklu, rychlost buněčné diferenciaci, velikost buněk, životní cyklus rostliny, stárnutí, maturace, dormance, germinace nebo genomová přeskupení, způsobená například aktivací transpozonu. Nicméně, je srozuměno, že analogické nebo jiné jedinečné procesy mohou být charakterizovány použitím zde popsanych způsobů u jakéhokoliv zkoumaného organismu.

Pojmem „zkoumaný organismus“ je myšlen jakýkoliv organismus, v němž je identifikován a charakterizován jeden nebo více QTL lokusů, například, ale ne pouze, rostlina (algae, bryophytes, ferns, angiosperm nebo gymnosperm), živočich, jednobuněčný organismus, bakterie, fytoplankton, kvasnice, houby, a také zahrnuje buněčné nebo tkáňové kultury těchto organismů.

Způsob podle vynálezu může být použit k určení hladiny transkriptů genu, který se vyskytuje ve specifickém místě genomu, a ke stanovení, zda hromadění kódovaného transkriptu nebo proteinu je regulováno geny umístěnými na lokusu kdekoli v genomu. S použitím analýzy genomu založené na mapování QTL (lokus kvantitativního znaku) je možné určit lokus asociovaný se změnami v akumulaci transkriptů nebo genových produktů. Proto geny nalezené v rámci těchto QTL lokusů by mohli kódovat členy multigenních rodin.

podléhající různému řízení transkripce (například, řízení využívající důležité cis-regulační sekvence, které následně ovlivňují regulaci transkripce, nebo působí na sekvence po směru nebo proti směru přepisu nezbytné pro zvýšenou translaci nebo stabilitu mRNA), různým transkripčním faktorům (zahrnujícím enhancery a represory), proteinům signálních transdukčních drah (například, protein kinázy, protein fosfatázy, 14-3-3 proteiny apod.), podléhající externím signálním receptorům, proteinům účastnícím se při regulaci hladin tzv. druhých posílů (Ca^{2+} , IP_3 , cAMP, atd.), nukleázám účastnícím se degradace transkriptů, proteázám a inhibitorům proteáz, novým regulačním faktorům transkripce.

Příklad přístupu použitého pro identifikaci regulačních genů řídících, zprostředkovávajících nebo ovlivňujících expresi jednoho nebo více zkoumaných genů je například, ale ne pouze omezeno na změnu v expresi jako odpověď na podnět prostředí, nebo jakákoliv událost ve zkoumaném organismu, která vede ke změně genové exprese zahrnuje:

- i) identifikaci prvního zkoumaného rodičovského organismu, který vykazuje odpověď na podnět prostředí, nebo jinak vykazuje fenotyp asociovaný se změněnou genovou expresí související se zkoumaným procesem a identifikaci druhého zkoumaného rodičovského organismu, který postrádá nebo nevykazuje tak silnou odpověď na podnět prostředí, nebo vykazuje jiný fenotyp související se změněnou genovou expresí spojenou se zkoumaným procesem, ať už se tato odchylka nachází v přírodě nebo je vyvolaná genovou mutací, narušením genu nebo genovou insercí. Je vhodné, ne však nezbytné, aby se první a druhý rodič odlišovali ve svých odpovědích na podnět, nebo se lišili ve změně genové exprese související se zkoumaným procesem, po dobu trvání odpovědi na podnět nebo ve změně genové exprese segregované v potomstvu;
- ii) křížení prvního a druhého rodiče za vzniku populace segregujícího potomstva. Populační typy mohou zahrnovat, ale nejsou omezeny na, rodiny F1 (od heterozygotních rodičů), F2 nebo F3 rodiny, rekombinantní inbrední linie, dvojité haploidy, zpětně křížené linie, testované křížené linie (test crosslines), a segregované nahosemenné megagametofyty (gymnosperm segregating megagametophytes);
- iii) jestliže je to požadováno, vystavení potomstva tohoto křížení požadovanému podnětu vnějšího prostředí;
- iv) extrahování RNA z jednoho nebo více orgánů, tkání nebo buněčných typů, například, v případě rostliny jako zkoumaného organismu, může být RNA získána z květů, zárodků, listů, stonku nebo kořenové tkáně, nebo buněk;

- v) měření hladin transkriptů jednoho nebo více zkoumaných genů s použitím jakékoliv vhodné metody, například, ale ne pouze, dot blottingu, Northern hybridizace, čipových analýz nebo kvantitativní PCR, čipové analýzy a kvantifikace hladiny genové exprese pro každé potomstvo;
- iv) příprava mapy genetických vazeb segregující populace s použitím kterékoliv vhodné metody, například, ale nejsou omezeny pouze na použití markerů založených na DNA, jako jsou RFLP (Restriction fragment Length polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), mikrosatelity, IMP (Inter MITE polymorphism) nebo SNPs (Single Nucleotide polymorphism), proteinové markery, morfologické markery k charakterizování jedinců mapované populace a zpracování dat získaných z jedné nebo více metod s cílem vytvořit dvou bodovou a multi bodovou analýzu vazeb pro vytvoření mapy vazeb;
- v) určení vztahu mezi markery na mapě vazeb a expresí jednoho nebo více zkoumaných genů v odpovědi na podnět prostředí, nebo expresi asociovanou se zkoumaným procesem, pro určení statisticky významných QTL. Takový vztah může být určen pomocí jakékoliv metody známé odborníkům v oblasti, například, ale nejsou omezeny pouze, jednobodové ANOVA analýzy, jednoduché regrese, intervalového mapování (interval mapping), kompozitní intervalové mapování (Composite interval mapping). Taková analýza může být provedena pomocí software MAPMAKER/QTL, MQTL, QTL kartograf, nebo jiného podobného softwaru. Je také spočtena statistická významnost a procento odchylek pro každý QTL.

Tento způsob tak, jak zde byl popsán, poskytuje účinný způsob pro důkladnou identifikaci mnoha, pokud ne všech, regulačních faktorů (genů) účastnících se řízení exprese zkoumaného genu a poskytuje odhad relativního příspěvku každého z faktorů k pozorovaným odchylkám v expresi zkoumaného genu, jakož i pro identifikaci umístění regulačního genu v genomu a asociovaných markerů, které lze použít při běžném šlechtění rostlin. Navíc, „hlavní vypínací“ regulační geny ovlivňující expresi více genů, například v kaskádě, mohou být identifikovány, pokud jsou současně analyzovány mnohonásobné geny spouštěné daným podnětem prostředí nebo související s určitým daným procesem.

Jakmile je identifikován jeden nebo více QTL lokus, který je významně asociovaný s expresí zkoumaného genu, pak každý z těchto lokusů a spojených markerů může být použit buď přímo jako marker, například, ale není to omezeno pouze pro účely šlechtění a screening,

včetně šlechtění rostlin, nebo mohou být dále charakterizovány pro určení genů účastnících se exprese zkoumaného genu s použitím metod klonování vycházejících z mapování, které budou známy odborníkům v oblasti. Například jeden nebo více známých regulačních genů může být lokalizováno v genomu, aby bylo určeno, zda se genové umístění těchto genů shoduje s QTL lokusy řídícími mRNA expresi zkoumaného genu. Potvrzení faktu, že takový shodný regulační gen ovlivňuje expresi jednoho nebo více zkoumaných genů, může být získáno pomocí běžných technik používaných v oboru, například, ale ne pouze, pomocí genetické transformace, genové komplementace nebo technik genového „knock outu“ nebo genové overexprese. Mapa genových vazeb může být také použita při izolaci regulačního genu, včetně jakýchkoli nových regulačních genů, prostřednictvím přístupů klonování založených na mapování, které jsou známy v oboru, kde markery umístěné v QTL jsou použity k nalezení zkoumaného genu pomocí vnášení velkých inzertů genomových klonů. Poziční klonování je jednou z těchto metod, které mohou být použity k izolování jednoho nebo více regulačních genů tak, jak bylo popsáno v práci Martin a kol. (Martin, G.B., Brommonschenkel, S.H., Chungwongse, J., Frary, A., Ganai, M.W., Spivey, R., Wu, T. Earle, E.D. a S.D. Tanksley, 1993, Science 262: 1432-1436; která je zde zahrnuta odkazem), ačkoliv mohou být použity také další vhodné metody, které budou známy odborníkům v oblasti. Další potvrzení, že takový shodný regulační gen ovlivňuje expresi jednoho nebo více zkoumaných genů, může být získáno pomocí genetické transformace a komplementace nebo pomocí technik genového knock-outu popsaných dále.

Proto je vynález zaměřen na identifikaci míst v genomu rostliny, které se účastní zprostředkování exprese jednoho nebo více zkoumaných genů jako odpovědi na podnět prostředí, nebo procesů spojených se změnou genovou expresí v rámci zkoumaného procesu. Vynález je také zaměřen na charakterizování identifikovaného QTL s cílem určit jeden nebo více regulačních genů a regulačních sekvencí v tomto lokusu.

Způsob podle vynálezu může být také použit pro identifikaci lokusu korespondujícího s faktory (kódované regulačními geny) spojenými s řízením nebo zprostředkováním exprese zkoumaného genu ve zkoumaném organismu. Tento způsob může být použit pro identifikaci regulačních genů řídících hladinu mRNA transkriptů jednoho nebo více zkoumaných genů, ať už se tato odchylka nachází v přírodě, nebo je způsobena genovou mutací, narušením genu nebo genovou inzercí, například, ale ne pouze, zkoumaných genů regulovaných faktory účastnícími se při:

- biotických stresech jako jsou například, ale ne pouze, viry, bakterie, houby, hmyz nebo červi;

- abiotických stresech zahrnujících, ale ne omezených, na chlad, mráz, vodu, sucho, osmotický tlak, teplo, soli, oxidaci a znečištění;
- vývojově, chemicky nebo prostředím řízené genové expresi;
- embryogenezi, například, ale ne pouze, při vývoji tkáně nebo orgánu, přičemž v případě rostliny může jít o vývoj semene, organogenezi nebo vývoj květu;
- minerální výživě, zahrnující jak mikro živiny, tak i makro živiny;
- světlo (hustota ozáření a kvalita světla);
- cirkadiálních, ultradiálních a dalších vnitřních rytmech;
- chemických indukátorech zahrnujících přirozené regulátory růstu, například, v případě rostliny jako zkoumaného organismu, to jsou auxiny, gibereliny, ABA, cytokininy, etylen a jejich analoga, syntetické hormony, herbicidy, kyselina salicylová,

nebo zkoumané geny mající výrazný vliv na biologické procesy, jako jsou:

- určení výnosu, například, ale ne pouze, u rostlin, určení sklíditelného výnosu, prostřednictvím vlivu regulačních genů na biomasu, tvorbu semen (velikost a počet), fotosyntetickou translokaci, místa spotřeby a zdrojů v rostlině, index listové plochy, poměr podzemních a nadzemních částí rostliny;
- nutriční hodnota biomasy například, ale není omezena pouze na sklizený materiál a související účinky na faktory kvality, jako jsou kofaktory, vitaminy, proteiny, antioxidanty, vysoce stravitelné vlákniny;
- morfologie u rostlin například, ale není omezena pouze na vliv regulačních genů na barvu květu (například geny účastnící se při syntéze antokyanů), výšku rostliny (například geny účastnící se při syntéze giberelinů), vzdálenost mezi kolénky, zakládání listů;
- rychlost buněčného cyklu například, ale ne pouze, u cyklinů;
- rychlost buněčné diferenciaci například, ale ne pouze, u proteinů homeodomén;
- velikost buněk, například, ale ne pouze, u rostlin, u genů účastnících se syntézy auxinů, receptorů, u genů indukovaných auxinem;
- životní cyklus organismu, například prostřednictvím působení regulačních genů na stárnutí, maturaci, domanci, germinaci;
- genomová přeskupení, například u transpozónové aktivace;

Navíc k použití způsobu podle vynálezu k identifikaci lokusu odpovídajícího transkripci, nebo k identifikaci jakýchkoli jiných faktorů řídících expresi genů ve

zkoumaném organismu pro různé požadované znaky, mohou být markery umístěné v těchto QTL lokusech použity také při aplikovaném šlechtění. Například, identifikované polymorfismy asociované s jedním nebo více identifikovanými genetickými markery umístěnými v lokusu (QTL lokus) mohou být použity pro diagnostické a selekční postupy založené na genomu:

- pro vysledování potomstva určitého organismu;
- pro určení hybridnosti určitého organismu;
- k identifikaci odchylek vázaných fenotypových znaků, znaků exprese mRNA, nebo obou, jak fenotypových znaků, tak znaků exprese mRNA;
- jako genetické markery pro vytvoření mapy genetických vazeb;
- k identifikaci individuálního potomstva zkřížení, kde potomstvo nese požadované genetické příspěvky od rodiče dárce, od rodiče příjemce nebo od obou, rodiče dárce i rodiče příjemce;
- k izolaci genomových DNA sekvencí obklopujících kódující nebo nekódující DNA sekvence, například, ale ne pouze, promotoru nebo regulační sekvence;
- při selekci s pomocí markerů (marker assisted selection), klonování založeném na mapování při potvrzení hybridu, fingerprintingové charakteristiky, genotypizaci a alelicky specifické markery; a
- jako marker ve zkoumaném organismu.

S použitím analýzy QTL založené na mapování, která zde byla popsána, může být identifikován regulační lokus asociovaný s expresí zkoumaného genu, na úrovni celého organismu, orgánu, tkáně nebo buňky, jako odpověď na podnět prostředí, nebo může být identifikován fenotyp asociovaný se změnou genovou expresí související se zkoumaným procesem. Například, což by nemělo být považováno za omezující v žádném směru, kandidátské regulační geny, které modulují expresi mRNA, jako (také viz Tabulka 2, Příklad 2):

- Transkripční faktory (proteiny s modulem a AP2 proteiny; otisk zinku „zinc-finger“, AP2 proteiny);
- Proteinkinázy aktivované mitogeny (MMK4, MMK3, MMK2, MMK1);
- Ca dependentní proteinkináza;
- Serin-threonin proteinkináza
- ATPáza transportující Ca^{2+} ;
- GTP vazebné proteiny;
- RNA vazebné proteiny;

- Proteinfosfatázy (typ 2A a 2C);
- Ca^{2+} vazebné proteiny, například kalmodulin;
- 14-3-3 proteiny;
- GTPázu aktivující proteiny;
- protein adenylcyklázy;
- Fosfolipáza C;
- Lipoxygenáza;
- Histon deacetyláza;
- Receptorové kinázy; nebo
- Fosfatidylinositol-3-kináza

mohou být vyhodnoceny s cílem určit, zda se vyskytují v oblastech genomu (QTL), které vysvětlují velkou část exprese chladem regulovaných genů u rostlin, například, ale ne na ni omezené, alfalfa (*Medicago falcata L.*).

Způsob, jak zde byl popsán, může být použit pro doplnění vysoce účinných výzkumů genomu založených na DNA čipových a mřížkových analýzách, nebo kteréhokoli jiného systému schopného měřit genovou expresi. S použitím segregujících se populací je možné určit umístění QTL regulujících transkripční úroveň genů, jejichž exprese souvisí se zkoumaným fenotypem (například odolnost vůči stresu a chorobám, biochemická produkce, morfologické odchylky atd.). Mapováním kandidátských genů na základě EST databázi zajišťuje potenciál pro ko-lokalizaci do důležitých QTL lokusů a dovoluje identifikaci alelického polymorfismu a vývoj alelicky specifických markerů. Identifikace těchto QTL a souvisejících regulačních genů může být použito pro diagnostické a selekční techniky založené na genomu pro odhad potenciálu genové exprese za daných vývojových podmínek a podmínek prostředí a pro koordinaci genové exprese v rámci vývoje, tkání nebo prostředí.

Genomové oblasti asociované s hladinami exprese genů, například, ale nejsou omezeny pouze na geny indukované nízkou teplotou, mohou být identifikovány s použitím analýzy mapující QTL. Tento přístup, používající úroveň genové exprese jako kvantitativní znak, umožňuje identifikaci řídících mechanismů genové exprese tím, že se hledání takových regulačních genů omezí na specifické oblasti genomu. Je také pravděpodobné, že se v těchto oblastech najdou i DNA sekvence odpovědné za odchylky v genové expresi. Způsob pro identifikaci genů, který zde byl popsán, bude rychlejší a snadnější s dostupností úplných genomových sekvencí a s rutinním začleněním zvyšujícího se počtu EST do podrobných map, nebo s využitím výhod značné ko-linearitě bloků genů v chromozomech příbuzných druhů při komparativním genetickém mapování.

Vysoce významné QTL identifikované v rámci uvedených příkladů, a neočekávaně vysoká úroveň odchylek, které tyto QTL vysvětlují, naznačuje možnosti použití QTL analýz genové exprese pro lokalizaci důležitých regulačních faktorů odpovědných za expresi genů indukovaných stresem. Srovnávací QTL analýzy četných genů indukovaných stejnými podněty prostředí nebo těch, které se účastní v daném procesu, umožňují objasnění komplexních drah regulujících genovou expresi a seskupení genů, které sdílejí podobné regulační faktory.

Způsob podle vynálezu bude použitelný u genů, jejichž exprese je regulovaná jakýmkoliv faktory pomocí použití segregujících populací na základě hladin exprese těchto genů. Umožní to identifikaci genomových oblastí, které lze použít pro charakterizování daného genotypu, bez vlivu prostředí nebo vývoje, což je vlastní pro metody založené na genové expresi.

Za účelem identifikace regulačních genů, které mohou být lokalizovány v jednom nebo více QTL lokusech, které vysvětlují podstatnou část odchylek v expresi jednoho nebo více zkoumaných genů, jsou produkovány sondy ze známých regulačních genů například, ale nejsou omezeny pouze na regulační geny zde uvedených v Tabulce 2 v Příkladu 2, a tyto regulační geny nebo produkty jejich exprese jsou umístěny do mapy vazeb. Tyto sondy mohou zahrnovat nukleotidové fragmenty nebo geny o plné délce pro detekci DNA nebo RNA, nebo protilátky pro detekci produktů exprese regulačního genu. Je nutné chápat, že neznámé regulační geny umístěné v jednom nebo více QTL lokusech mohou být také identifikovány použitím metod, které jsou známy odborníkům v oblasti, například, ale nejsou omezeny pouze na poziční klonování a mapování částí sekvencí DNA s cílem určit, zda je klonovaná DNA spolulokalizovaná do stejného místa jako jeden nebo více identifikovaných QTL. S výhodou je umístění kandidátských regulačních genů do jednoho nebo více QTL lokusů potvrzeno, například pomocí mapování oblastí nacházejících se proti směru nebo po směru exprese od každého domnělého regulačního genu na mapě vazeb. Tímto způsobem jsou k další charakterizaci použity pouze regulační geny charakteristické tím, že obsahují 5' nebo 3' oblasti, které jsou spolulokalizovány se stejnými QTL lokusy.

Potom mohou být izolovány a charakterizovány regulační geny, které jsou lokalizovány uvnitř jednoho nebo více QTL asociovaných s expresí jednoho nebo více zkoumaných genů, může být modulována exprese těchto regulačních genů v rámci transgenní rostliny, například, ale ne pouze, alfalfa, s cílem odhadnout jejich vliv na expresi zkoumaného genu a pokud je to požadováno, také jejich vliv na odpověď zkoumaného organismu na stres způsobený vnějším prostředím. Takové analýzy mohou zahrnovat, ale ne pouze, komplementaci nebo genový

„knock-out“, a aktivaci genu, studie zahrnující transformaci zkoumaného organismu konstruktem kódujícím překládanou nebo k ní komplementární sekvenci regulačního genu nebo enhancerovou sekvenci. Zkoumaný organismus postrádající nebo vykazující jen slabou odpověď na podnět prostředí, nebo zkoumaný proces, je transformován pomocí konstruktu kódujícího překládanou sekvenci regulačního genu, zatímco zkoumaný organismus vykazující silnou odpověď, nebo pozitivně se projevující ve zkoumaném procesu, je transformován pomocí konstruktu kódujícího komplementární sekvenci k překládané sekvenci regulačního genu, nebo může být rozrušen insercí cizí DNA, jako je T-DNA, do kódující oblasti genu, nebo aktivován pomocí inserce 5' nebo 3' sekvence enhanceru transkripce zkoumaného genu. Expresi jednoho nebo více zkoumaných genů a regulačního genu může být potom sledována s cílem určit vliv inserce sekvence překládané nebo k ní komplementární, genového knock-outu nebo vložení sekvence zesilovače transkripce do regulačního genu na odpověď organismu na podněty prostředí nebo na zkoumaný proces. Lze také určit vliv inserce konstruktu kódujícího sekvence překládané nebo k ní komplementární, genového knock-outu nebo vložení sekvence zesilovače transkripce na fyziologickou odpověď na stres způsobený vnějším prostředím.

Uvažuje se také, že regulační gen umístěný ve specifickém QTL lokusu, nebo skupině QTL lokusů, může být také použit jako signální znak pro tento jeden nebo více QTL v rámci šlechtitelského programu.

Proto se vynález také vztahuje k vhodnému způsobu identifikace regulačního genu zprostředkujícího expresi zkoumaného genu, která zahrnuje:

- i) přípravu mapy vazeb zkoumaného organismu;
- ii) identifikaci jednoho nebo více QTL lokusů, které vysvětlují podstatnou část odchylek v expresi jednoho nebo více zkoumaných genů; a
- iii) izolování a mapování jednoho nebo více regulačních genů s cílem určit, zda jsou tyto regulační geny lokalizovány v oblasti jednoho nebo více identifikovaných QTL lokusů.

Vynález je také určen ke zprostředkování odpovědi zkoumaného organismu na stres způsobený vnějším prostředím, nebo k charakterizaci *in vivo* vlivu identifikovaného a izolovaného regulačního genu umístěním tohoto regulačního genu do zkoumaného organismu, případně určení vlivu regulačního genu na expresi jednoho nebo více zkoumaných genů, nebo jeho vliv na odpověď zkoumaného organismu na podnět prostředí.

Výše uvedený popis není zamýšlen jako omezující nároky podle vynálezu jakýmkoliv způsobem, navíc diskutovaná kombinace znaků nemusí být naprosto nezbytná pro řešení vynálezu.

Stručný popis obrázků

Tyto a další rysy vynálezu budou osvětleny pomocí následujícího popisu, v němž jsou uvedeny odkazy na zde připojené obrázky:

Obr. 1 ukazuje mapu vazeb diploidu alfalfa. Lokusy jsou uvedeny na pravé straně a rekombinační vzdálenosti (cM, centimorgany) jsou uvedeny na levé straně každé skupiny vazeb. Čáry na pravé straně každé skupiny vazeb ukazují přibližné umístění lokusu. Chladem regulované (msaCI) geny jsou dvakrát orámovány a geny homologické s geny s regulační funkcí jsou umístěny v jednom rámečku. Geny, které jsou členy multigenních rodin jsou číselně odlišeny, například C3358.1 a C3358.3.

Obr. 2 : Umístění a statistická hodnota (hodnota LOD) QTL lokusů pro LT₅₀ a chladem regulované exprese genů msaCI. Geny msaCI jsou dvakrát orámovány a geny homologní s geny, které mají regulační funkci, jsou v jednom rámečku. Pokud je genová exprese QTL lokusů identifikována v tkáních korunky i listů, je nahoře umístěn graf pro LOD hodnoty exprese v korunce a graf pro hodnoty LOD pro expresi v listech je umístěn dole. QTL lokusy LT₅₀ se týkají celé rostliny a jsou nezávislé na typu tkáně. Geny, které jsou členy ultigenních rodin jsou číselně odlišeny, například C3358.1 a C3358.3.

Obr. 3 ukazuje příklad analýzy exprese zkoumaného genu pomocí dot-blotu, v tomto případě msaCIA genu, v segregující populaci F2 diploidu alfalfa. Každá skvrna odpovídá jedinečnému genotypu kromě posledního sloupce, kde je umístěna třikrát kontrola. Hladina transkriptů je kvantifikována denzitometricky a je použita jako kvantitativní znak pro analýzu QTL. Hodnota optické hustoty je uvedena pro každý genotyp a kontrolu.

Příklady provedení vynálezu

Vynález bude dále objasněn pomocí následujících příkladů. Nicméně se rozumí, že tyto příklady jsou zde uvedeny pouze pro vysvětlení a neměly by být limitující pro předmět vynálezu jakýmkoliv způsobem.

Příklad 1: Identifikace QTL lokusů souvisejících s chladem regulovanou genovou expresí

Obecný popis experimentálního přístupu

Jako příklady kvantitativních znaků charakterizovaných v rámci klonovaných diaspor genotypů F₂ diploidu alfalfa jsou použity exprese chladem regulovaných genů (*msaCI*) a fenotypy LT₅₀. Znaky segregace fenotypů (*msaCI* genová exprese a LT₅₀) jsou použity při hledání lokusu kvantitativního znaku (QTL) v mapě vazeb genomu diploidu alfalfa.

Rostlinný materiál

F₁ populace je vytvořena křížením (intercrossing) diploidních rodičů vykazujících protikladnou toleranci vůči chladu (*M. falcata* x *M. sativa*). F₁ linie je produkována pomocí křížového opylení mezi genotypem *M. sativa* citlivým na chlad pocházejícím z kultivovaného alfalfa ze skupiny diploidní úrovně jako samičím rodičem a s mrazuvzdorným diploidním genotypem z *M. falcata* cv. Anik (Pankiw, P. a Siemens, B. 1976. Can. J. Plant Sci. 56: 203-205) jako samčím rodičem. Květy jsou oslabeny a potom ručně opylovány. Jeden namátkově vybraný genotyp F₁ je rozmnožen pomocí ručního opylování a potomstvo F₂ z tohoto křížení je použito k produkci mapy vazeb a pro analýzu QTL.

Podmínky růstu

Řízky ze 117 genotypů F₂ byly rozmnožovány klonováním a poté, co se objevily kořínky, byly přesazeny do hlubokých kontejnerů. Klonované diaspor (rozmnožovací jednotky rostlin) jsou potom pěstovány za kontrolovaných podmínek prostředí při 21 °C ve dne a při 17 °C v noci s 16 hodinami světla denně při ozáření o hustotě toku fotonů přibližně 225 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Podmínky chladové aklimatizace

Rostliny jsou dva týdny aklimatizovány na chlad v růstových komorách při 2 °C s 8 hodinovým obdobím světla a při osvětlení o hustotě toku fotonů přibližně 125 $\mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Stanovení LT₅₀

Klonované diaspor každého genotypu ze segregujících populací a rodičovských genotypů jsou vystaveny testu mrazem tak, jak byl popsán v Castonguay a kol. (Castonguay, Z., Nadeau, P., a S. Laberge 1993. Plant Cell Physiol. 34: 31-38). Rostliny jsou vystaveny po krocích se snižující okolní teplotě, během této doby jsou v intervalech odebírány jednotlivé rostliny, které se potom nechají růst tři týdny za počátečních růstových podmínek (21 °C/17 °C, denní a noční teploty, v tomto pořadí) a potom je stanoveno přežití rostliny.

Pomocí metody SASTMprobit (Systém statistické analýzy, Cary, NC) je určena teplota, která je letální pro 50 % populace (LT₅₀). Jsou provedena tři opakování neúplného blokového vzoru s cyklickými permutacemi (12 bloků), aby byla provedena statistická srovnání velkého počtu ekotypů použitých v pokusu.

Popis msaCI genů

V této studii bylo použito sedm msaCI genů izolovaných z knihovny cDNA z korunky tetraploidu alfalfa, který byl aklimatizován na chlad (*M. sativa* cv. Apica; Laberge, S, Castonguay, Y. a Vézina, L.-P. 1993. Plant Physiol 101, 1411-1412; Castonguay, Y., S. Laberge, P. Nadeau, a L.-P. Vézina. 1997. str.175-202. In B.D. McKersie a D.W. Brown (ed.). Biotechnology and the improvement of forage legumes. CAB International, Wallingford, UK):

msaCIA	na glycin bohatý protein (glycine reach)	Laberge a kol. (1993)*
msaCIB	domnělý jaderný protein (putative nuclear protein)	Monroy a kol. (1993)**
msaCIC	bimodulární protein (bimodular protein)	Castonguay a kol. (1994)***
msaCID	protein spojený s patogenezí (pathogenesis-related protein)	nepublikováno
msaCIE	glyceraldehyd-3P-dehydrogenáza	nepublikováno
msaCIF	galaktinol syntáza	nepublikováno
msaCIG	protein podobný dehydrinu (dehydrin-like)	nepublikováno

*Laberge, S, Castonguay, Y. a Vézina, L. -P. 1993. Plant Physiol. 101, 1411-1412.

**Monroy. A.F., Castonguay, Y., Laberge, S., Sarhan, F., Vézina, L.-P. a Dhindsa, R.S. 1993. Plant Physiol. 102, 873-879.

***Castonguay, Y., Laberge, S., Nadeau, P. a Vézina, L.- P. 1994. Plant Mol. Biol. 24, 799-804.

Extrakce RNA

Přibližně 0,5 g (čerstvé váhy) listové tkáně z každého genotypu aklimatizovaného na chlad je v tekutém N₂ v třecí misce rozdrobeno paličkou na jemný prášek. Celková RNA je extrahována s použitím standardních metod tak, jak byly dříve popsány (Castonguay a kol. 1994. Plant Mol. Biol. 24, 799-804). Celková RNA je kvantifikována pomocí UV absorpce při 260 nm (Fourney, R.M., J. Miyakoshi, R. S. Day III, a M.C. Paterson. 1988. Focus 10:1).

Kvantifikace dot blotu

Pro každý rodičovský genotyp a pro každý genotyp segregující populace se použije 5 µg celkové RNA a ta se pomocí vakua přenese na nylonovou membránu (Hybon N⁺, Amersham Pharmacia Biotech, Oakville, ON) s použitím přístroje Bio-DotTM (Bio-Rad, Mississauga, ON) a imobilizuje se příčnou vazbou pod UV světlem po dobu 3 minut. Membrány jsou hybridizovány přes noc při 68 °C v 2x SSC, 0,25 hmotn./obj.% sušeném nízkotučném mléce, 1% SDS s [³²P]dCTP-značenou sondou připravenou z přečištěných insertů chladem regulovaných genů podle standardních protokolů (Sambrook, J., Maniatis, T. a Fritsch. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York). Pro expozici membrán byl použit film Kodak X-Omat AR5 při teplotě -80 °C a hladina transkriptů byla kvantifikována denzitometrickou analýzou autoradiografií s použitím softwaru OneD ScanTM (Scanalytics inc., Billerica, MA). Na obr. 3 je příklad dot blotu získaného s použitím msaCIA genu jako sondy. Pro standardizaci hybridizačního signálu u všech membrán byla použita průměrná hodnota hladiny transkriptu u všech vzorků na každé membráně.

Mapa vazeb

Konstrukce mapy genetických vazeb je založena na AFLP a RFLP. DNA je extrahována z 1 až 2 g čerstvé listové tkáně klonálních diaspor starých 4 až 6 týdnů. Metoda extrakce je provedena přesně tak, jak je popsáno v Doyle a Doyle (Doyle, J.J., a Doyle, J.L. 1990. Izolace rostlinné DNA z čerstvé tkáně. FOCUS 12, 13-15), s výjimkou, že listová tkáň je rozdrcena při teplotě místnosti bez použití tekutého dusíku.

Pro zjištění RFLP markerů se použije DNA přečištěná ze 169 genotypů F₂, každá DNA je samostatně podrobena štěpení s použitím restričních enzymů *DraI* a *EcoRV*. Každý štěpený vzorek DNA (6 µg od každého genotypu) je separováno na horizontálních gelech (0,9 % agarózy, 1 x TAE), a separované fragmenty jsou pomocí kapilárního blotingu přeneseny na nylonové membrány (Hybond N⁺, Amersham Pharmacia Biotech, Oakville, ON). Pro simultánní analýzu segregace s více sondami je vytvořeno deset duplikátů (duplicate copies) membrán. Membrány jsou hybridizovány přes noc při teplotě 65 °C se sondami značenými [³²P]-dCTP. DNA sondy se skládají z náhodně vybraných cDNA a cDNA vybraných podle jejich homologie s regulačními geny, které byly v obou případech získány z knihoven cDNA pro *Medicago sativa*, a ze 7 msaCI cDNA zde popsaných. Nejdříve jsou pomocí PCR specificky amplifikovány inzerty cDNA a označeny pomocí náhodného hexamerního značení s použitím Kitu T7 QuickPrimeTM (Amersham Pharmacia Biotech,

Oakville, ON). Prehybridizace, hybridizace a značení sondy jsou provedeny podle standardních postupů (Sambrook, J., Maniatis, T. a Fritsch. 1989. *Molecular cloning: A Laboratory manual*. Cold Spring harbor Laboratory Press, Col Spring Harbor, New York).

Pro identifikaci AFLP markerů jsou DNA z F_2 vystaveny restriční enzymům *Eco* RI a *Mse*I, které jsou ligovány s *Eco*- a *Mse*- specifickými primerovými adaptéry, a poté amplifikovány pomocí *Eco* a *Mse*- pre-selektivních primerů (vos. P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van der Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Pelerman, J., Kuiper, M, a Zabeau, M. 1995, *Nucleid Acids Res.* 23, 4407-4414). Před-selektivní amplikony jsou 20x zředěny a jsou použity jako materiál pro selektivní amplifikaci. Oba primery *Eco* a *Mse* použité při selektivní amplifikaci obsahovaly na 3' konci 3 selektivní nukleotidy. Primer *Eco* je označen barvivem IRD, které umožňuje detekci amplikonů infračerveným laserem s pomocí automatického sekvenátoru (LI-COR, Inc. Lincoln, Neb, USA). Selektivní amplifikace je provedena podle postupů „dosednutí“ („touch down“) popsanych ve Vos a kol. (1995, *Nucleid Acids Res.* 23, 4407-4414). Po ukončení selektivní amplifikace byly amplikony odděleny na 25 cm polyakrylamidových gelech složených z 7% Long Ranger akrylamidu v prostředí 7 M močoviny a 0,6 x TBE, s použitím automatického DNA sekvenátoru Li-COR model 4000L.

Genová mapa diploidního křížence je vytvořena s použitím segregčních dat ze 112 RFLP a 117 AFLP segregčních markerů. Spolusegregční analýzy jsou provedeny s použitím MAPMAKER/EXP 3,0 softwaru (Lander, E.S., Green, P., Albertson, J., Barlow, A., Daly, M.J. Lincoln, S.E., a Newburg, L 1987. *Genomics* 1, 174-181) pro určení skupiny vazeb každého markeru a lokalizaci každého molekulárního markeru uvnitř každé skupiny vazeb. Jednotlivé skupiny vazeb jsou získány s použitím dvoubodové analýzy s minimální hodnotou LOD 15 a maximální úrovní rekombinace 30 %. Potom je k určení lokusu uvnitř vazbových skupin použita mnohočetná bodová analýza s limitem LOD 2,0. Výsledná mapa (Obr. 1) pokrývá přibližně 1400cM (centimorganů) a má průměrný interval markeru přibližně 8 cM. Patnáct signálních znaků zůstalo nezařazeno.

Identifikace QTL lokusu asociovaného s expresí *msaCI* genů a s odolností vůči mrazu

QTL lokusy účastníci se exprese *msaCI* genů jsou identifikovány s pomocí MARKER/QTL v 1.1. (Lander, E.S., a Boststein, D. 1989, *Genetics* 121, 185-199). V mapě vazeb je zjišťována přítomnost QTL lokusů ve specifických oblastech genomu s využitím exprese každého genu jako kvantitativního znaku. Je určeno působení každého QTL ve vztahu

jeden k druhému a je určeno procento odchylek v expresi *msaCI* genu vysvětlované každým QTL. Jako prahové LOD skóre pro identifikaci QTL je považována hodnota 2.

Analýzy chladem regulovaného hromadění transkriptů pro každý ze sedmi *msaCI* genů odhalují velkou genotypovou variabilitu pro jejich expresi (v několika případech) s 10 až 40 násobnými odchylkami v expresi mezi genotypy (např. viz Obr. 3).

Pro všech 7 *msaCI* genů byly nalezeny QTL lokusy spojené s variabilitou úrovně transkripce *msaCI* genu pozorované u různých genotypů, a pro fenotyp LT_{50} (Tabulka 1). Geny hrající důležitou regulační roli v expresi *msaCI* genů byly nalezeny uvnitř těchto QTL. Počet QTL lokusů spojených s expresí *msaCI* genů se lišil od 1 (*msaCIF*) až po 5 (*msaCIC*). Ve většině případů byly jejich hodnoty LOD velmi významné. Fenotypové odchylky vysvětlené těmito QTL lokusy se lišily v rozmezí od 10 do 60 %. Ve většině případů byla zvýšená exprese a mrazová odolnost, respektive, způsobeny alelou z rodiče *M. falcata* odolného na chlad.

Jsou identifikovány 3 QTL spojené s odolností vůči mrazu (LT_{50}). Dva z těchto QTL jsou umístěny ve skupině vazeb E v genomové oblasti asociované také s expresí *msaCIB* a *msaCID*.

Bylo zjištěno, že QTL lokusy pro expresi *msaCI* genů jsou asociované s umístěním odpovídajících strukturních genů pro *msaCIA* (viz skupina vazeb D, Obr. 2), *msaCID* (viz skupina vazeb E, Obr. 2) a *msaCIG* (skupina vazeb F, Obr. 2).

V případě *msaCID* se RFLP lokus překrývá s expresními QTL pro tři geny; samotný *msaCID* gen, *msaCIA* a *msaCIB* (viz skupina vazeb E, Obr. 2). Tento fakt naznačuje, že *msaCID* je buď regulačním genem, nebo se regulační gen nachází v jeho sousedství.

Byly pozorovány QTL pro expresi v tkáni korunky a v listové tkáni umístěné ve stejné genotypové oblasti pro *msaCIA* (mezi 120-130 cm, Obrázek 2, skupina vazeb E) a pro *msaCID* (viz skupina vazeb E, Obr. 2). Jinak byly lokusy ovlivňující expresi v každém typu tkáně rozdílné. QTL lokusy řídící expresi několika *msaCI* genů jsou umístěny ve skupinách vazeb B a E, což napovídá běžný regulační mechanismus. Obzvlášť pozoruhodným příkladem je QTL ve skupině vazeb B, který vykazuje vliv na expresi pěti studovaných *msaCI* genů v listové tkáni (Obr. 2, Tabulka 1).

Tabulka 1: QTL spojený s mRNA expresí chladem regulovaných genů a odolností vůči mrazu u diploidu alfalfa. Jsou zde uvedeny skupiny vazeb asociované s genovou expresí v listech nebo korunce, nebo odolností vůči mrazu (LT_{50}) spolu s hodnotami LOD. Jsou identifikovány

regulační geny, které jsou lokalizovány do těchto genotypových oblastí. Zvýrazněné geny C4494 a C2186 vykazují homologii s genem CBF1 z *Arabidopsis* a s genem SCOF-1 ze sóji, v tomto pořadí, u nichž byla prokázána účast na odolnosti vůči chladu. (* údaje nejsou uvedeny na Obr. 2).

Gen/znak	Vazbová skupina		LOD		Kandidátský regulační gen		Homologie s geny kódujícími
	Korunka	List	Korunka	List	Korunka	List	
msaCIA		B		3		C2784	Serin/threonin-proteinkináza
	D		11		msaCIA		
	D		9		C2314		Fosfatáza 2C
	D		9		C5047		Proteinkináza podobná receptoru bohatému na opakování leucinu (LRR)
	D		9		C2250		GTP vazebný protein (Ras-related)
	E		4		msaCID		
msaCIB	E	E	4	5	C4320	C4320	Mitogenem aktivovaná protein kináza
		E		4		C271	Serin protein kináza
		E		4		C948	Kasein kináza I
		E		4		C3749	Protein kináza týkající se R2CDC2+/CDC28
		B		3		-	
	E		4		msaCID		Etanolamin kináza
	E		4		C3283		



Gen/znak	Vazbová skupina		LOD		Kandidátský regulační gen		Homologie s geny kódujícími
	Korunka	List	Korunka	List	Korunka	List	
msaCIC	A	F	4	5	C4546	C4494	transkripční faktor s AP2 doménou (CBF1 homolog
		A		5		C2595	Mitogenem aktivovaná proteinkináza (MAP3K,
		A		5		C374	Kalretikulin
		A				C3358	Peptidyl-Prolyl cis-trans izomeráza
	B	A	6		C168 C2420	C2886	Adenosinkináza s cyklázou asociovaný protein (CAP)
		B		3			
		G					
msaCID	I*		5				
	J*		6				
		K*		5			
		B		5		C2784	Serin/threonin-protein kináza
	E	E	14	8	msaCID	msaCID	
msaCIE	E	E	10	5	C5237	C5237	Protein 48 cyklu buněčného dělení
	E	E	12	8	C3346	C3346	Transkripční faktor rozeznávající promotory reagující na etylen
msaCIF	E	E	7	4	C3283	C3283	Etanolamin kináza
	J*		5				
	L*		6				
msaCIE		B		8		C2784	Serin/threonin-protein kináza
	H*		5				
msaCIF		I*		3			

MsaCIG		B		4		C2784	Serin/threonin-proteinkináza
LT 50	F		6		msaCIG		
	C		6		C2456		GTP vazebný protein jádra (RAN1A)
	C		4		C2186		Transkripční faktor s motivem otisk zinku „zinc finger“ (SCOF-1)
	E		4		C5237		Protein 48 cyklu buněčného dělení
	E		4		C3283		Etanolamin kináza

Příklad 2:

Izolace regulačních genů a regulačních sekvencí asociovaných se zkoumanými QTL lokusy.

Obecný popis experimentálního přístupu

Detekce QTL lokusů, které vysvětlují podstatnou část odchylek v expresi msaCI genů naznačuje možné umístění regulačních genů v těchto lokusech. Je zmapováno množství exprimovaných sekvenčních tagů (EST) na chlad aklimatizovaného alfalfa kódujících genů se známými funkcemi v regulaci genové exprese. Jsou izolovány a charakterizovány kandidátské regulační geny umístěné uvnitř QTL asociovaných s expresí msaCI genů, a je zkoumána jejich exprese u transgenního alfalfa s cílem odhadnout jejich vliv na genovou expresi regulovanou chladem.

Popis kandidátských regulačních genů

Z knihovny λ gt10 cDNA připravené z mRNA, která byla izolována z korunek tetraploidu alfalfa (*M. sativa* L. cv. Apica; R. Michaud, C. Richard, C. Willemont a H. Gasser 1983. Can. J. Plant Sci. 63: 547-549) je izolována série EST vykazujících homologii s geny se známými regulačními funkcemi:

Transkripční faktory (motiv otisk zinku „zinc-finger“ a AP2 proteiny)

Mitogenem aktivované proteinkinázy (MMK4, MMK3, MMK2, MMK1)

Kalcium dependentní proteinkinázy

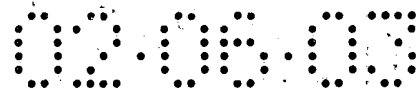
Serin/threonin protein kináza

ATPáza přenášející Ca^{2+}

GTP vazebné proteiny

RNA vazebné proteiny

Protein fosfatázy (typ 2A a 2C)



Kalmodulin
 14-3-3 proteiny
 GTPázu aktivující proteiny
 Protein adenylcykláza
 Fosfolipáza C
 Lipoxygenáza
 Ca²⁺ vazebné proteiny
 Histon deacetyláza
 Receptor kináza
 Fosfatidylinositol 3-kináza

Genetické mapování kandidátských regulačních genů

Pomocí PCR amplifikace jsou připraveny sondy pro specifické regulační geny uvedené v tabulce 2, jsou čištěny na Sepharyl S-200 MicroSpin kolonách (Amersham Pharmacia Biotech, Oakville, ON) a skladovány při -20 °C. Tyto sondy jsou použity pro Southern hybridizaci k štěpené DNA z F₂ diploidních genotypů potomstva křížení, které bylo popsáno v příkladě 1. Přechištěné sondy jsou radioaktivně značeny pro zvýšení specifické aktivity pomocí náhodného hexamerního značení a jsou hybridizovány na DNA bloty podle standardních protokolů pro RFLP, jak bylo popsáno v příkladě 1 (Sambrook, J., Maniatis, T. a Fritsch, 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Col Spring Harbor, New York). Regulační geny, které jsou polymorfní, a které jsou lokalizovány spolu s jejich domnělými funkcemi založenými na homologii se sekvencemi uvedenými v data bázích GENBANK/EMBL jsou uvedeny v Tabulce 2.

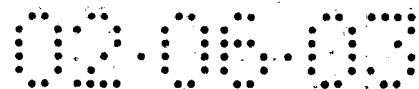
Tabulka 2 Polymorfní regulační geny a jejich předpokládaná funkce. Zvýrazněné klony ukazují potenciální kandidátské geny účastnící se regulace msaCI genů nebo odolnosti vůči mrazu (LT₅₀).

Klon	Homologie k
C102	Obránce proti smrti apoptózou-1 (defender against apoptotic death-1)
C103	Pumilio RNA vazebný protein (pumilio RNA binding protein)
C113	Nukleolin
C123	vazebný protein EF-„hand“ vápníku (EF-hand calcium binding protein)

C127	MADS transkripční faktor (MADS transcriptional factor)
C157	ABA-indukovaný protein (ABA induced protein)
B166	GTP vazebný protein (GTP binding protein)
A168	Transkripční faktor
C183	GTP vazebný protein (GTP binding protein)
B187	G-box vazebný protein (G-box binding protein)
A207	Protein kináza C (substrát)
C221	Tyrosin fosfatáza
A271	Serin protein kináza
C343	Homeobox protein (Knotted-1)
C374	Peptidyl-Prolyl cis-trans isomeráza
C389	ABA responzivní zesilovač transkripce
C532	transkripční faktor s motivem helix-smyčka-helix
C571	GTP vazebný protein
C834	P72 DEAD box protein
C948	Kasein kináza
C973	Mitogenem aktivovaná proteinkináza (MMK4)
C2105	WRKY3 DNA vazebný protein
C2186	transkripční faktor s motivem otisk zinku „zinc finger“ (SCOF-1 homolog)
C2250	GTP vazebný protein (týkající se - Ras)
C2314	Fosfatáza 2C
C2352	Progesteron vazebný homolog
C2420	Protein podobný ATPáze přenášející Ca^{2+}
C2426	Na etylen citlivý malý GTP vazebný protein
C2456	GTP vazebný protein (RAN1A)
C2595	Kalretikulin
C2658	Proteinkináza s kalmodulinovou doménou (CDPK)
C2784	Serin/threonin protein kináza
C2886	Cykláza-asociovaný protein (CAP)
C2939	Transkripční faktor s AP2 doménou (TINY-podobnost)
C2988	Proteinkináza podobná receptoru bohatému na opakování leucinu (LRR)
C3050	Protein kináza

C3125	Protein vážící nukleovou kyselinu
C3253	Receptor kináza
C3268	Serin/threonin protein kináza
C3283	Etanolamin kináza
C3291	ARG-2 protein vyvolaný(spouštěný) IAA
C3346	Transkripční faktor citlivý na etylen
C3358	Adenosin kináza
C3367	RNA vazebný protein
C3506	Protein kináza
C3520	Nukleotid vazebný protein
C3601	Ring-H2finger protein
C3604	Transkripční faktor
C3626	DNA vazebný protein
C3749	CDC2+/CDC28-příbuzná protein kináza R2
C3843	Fosfatidylinositol 3-kináza
C3844	GTP vazebný protein (RAB-tyt)
C4050	Serin/threonin fosfatáza typ 2A
C4266	Protein podobný RAC (RHO homolog)
C4320	Mitogenem aktivovaná protein kináza
C4438	14-3-3 protein
C4494	Transkripční faktor s AP2 doménou (CBF1 homolog)
C4546	Mitogenem aktivovaná proteinkináza (MAP3K)
C4622	Proteinkináza s kalmodulinovou doménou (CDPK)
C5047	Proteinkináza podobná receptoru bohatému na opakování leucinu (LRR)
C5206	Homeobox protein (Knotted-1)
C5237	Protein 48 cyklu buněčného dělení

EST sekvence jsou také použity pro vytváření primerů pro amplifikace identifikovaných lokusů jako STS (Sequence Tagged Sites) z DNA od jedinců segregující populace. Pokud jsou výsledné PCR produkty monomorfni mezi jedinci populace, jsou PCR produkty štěpeny s použitím různých enzymů, aby se zjistil polymorfismus. Jestliže není odhalen žádný



polymorfismus sekvenují se jednotlivě PCR produkty získané od dvou rodičů a hledají se SNP (Single Nucleotide Polymorphism).

Jako RFLP fragmenty jsou lokalizovány kandidátské regulační geny zde popsané v rámci potomstva F₂, jak je popsáno v Příkladě 1, s cílem stanovit, zda jsou umístěny uvnitř QTL lokusů spojených s odchylkami u chladem vyvolané exprese msaCI genů, jak bylo zjištěno v Příkladě 1.

Všechny geny uvedené v Tabulce 1 a vyznačené v Tabulce 2 jsou umístěny v oblastech genomu obsahujících QTL lokusy a proto jsou domnělými kandidáty na regulační geny exprese msaCI genů, vlastnosti LT₅₀, nebo jejich kombinace. Dva z těchto genů, C4494 a C2186, vykazují homologii k CBF1 genu z *Arabidopsis* a SCOF-1 genu ze sóji, v tomto pořadí, u nichž byla prokázána účast na odolnosti vůči chladu (Jaglo-Ottosen, K.R., Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Schabenberger, O., a Thomashow, M. F. 1998. *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* 280: 104-106. Kim, J.C., Lee, S.H., Chsong, Y.H., Yoo, C.-M., Lee, S.L., Chun, H.J., Yun, D.J., Hong, J.C., Lee, S.Y., Lim, C.O., a Cho, M.J., 2001. Nový, chladem indukovatelný protein s motivem otisk zinku neboli "zinc finger" ze sóji, SCOF-1, zvyšuje chladovou toleranci u transgenních rostlin. *The Plant Journal* 25: 247-259). Gen C4494 (homolog CBF1) je umístěn v QTL lokusu souvisejícím s expresí msaCIB v listech skupina vazeb F, Obrázek 2), zatímco gen C2186 (homolog SCOF-1) je lokalizován do oblasti obsahující QTL lokus pro LT₅₀ (skupina vazeb C, Obr. 2). Tyto geny kódují chladem indukované transkripční faktory, u nichž bylo jednoznačně prokázáno, že řídí konstitutivní expresi COR (msaCI) genů u transgenních rostlin a zvyšují odolnost vůči mrazu za podmínek na něž nebyly aklimatizovány.

Výsledky také naznačují množství nových zajímavých kandidátských regulačních genů účastnících se exprese genů odolnosti vůči chladu a msaCI genů (tabulka 1, Obr. 2). Například klon C2784, který vyazuje homologii k serin-threoninproteinkináze je lokalizován do oblasti ve skupině vazeb B, kde se nacházejí QTL lokusy pro expresi msaCIA, msaCID, msaCIE a msaCIG v listech. V buňkách alfalfa vedl osmotický stres k rychlé aktivaci dvou proteinkináz. Jedna z těchto kináz je homologní k ASK1 serin-threoninkináze z *Arabidopsis* (Munnik, T. a H.J.G. Meijer. 2001. *FEBS Letters* 798: 172-178). Potvrzení úlohy těchto kandidátských regulačních genů může být dosaženo pomocí postupů zde naznačených.

Sekvenování genomových klonů kandidátských regulačních genů a kandidátských regulačních sekvencí.

Z genomové knihovny vytvořené u EMBL3 fága (Sambrook, J., Maniatis, T. a Fritsch. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) jsou s použitím DNA od dvou rodičů zde identifikovaných izolovány EST kandidátských regulačních genů lokalizovaných do jednoho nebo více QTL lokusů spojených s odchylkami v expresi *msaCI* genů. Každý kandidátský regulační gen je sekvenován v celém svém rozsahu, který zahrnuje oblasti proti i po směru exprese kódující oblasti, s použitím dideoxynukleotidové řetězové terminační metody (dideoxynucleotide chain termination method, Sambrook, J., Maniatis, T. a Fritsch. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York). Jsou také provedena srovnání pro alelické formy každého z rodičů, aby byly identifikovány mutace odpovědné za QTL. Potvrzení umístění kandidátských regulačních genů je prováděno pomocí mapování oblastí po směru i proti směru exprese každého regulačního genu na mapě vazeb vytvořené dříve. Pro další charakterizaci jsou v komplementových studiích nebo studiích s genovým „knock-outem“ použity pouze regulační geny charakterizované přítomností 5' nebo 3' oblastí kolokalizovaných společně spolu se stejným jedním nebo více QTL lokusy.

Změněná exprese kandidátského genu u transgenních rostlin (komplementační studie a studie genového „knock-outu“)

Transformace alfalfa je provedena s použitím *Agrobacterium tumefaciens*, jak bylo dříve popsáno v práci Desgagnés a kol. (Desgagnés R., S. Laberge, G. Allard, H. Khoudi, Y. Castonguay, J. Lapointe, R. Michaud a L.-P. Vézina. 1994. Plant Cell Tissue Organ Cult 42:129-140). Jsou použity dva přístupy; 1) Konstitutivní exprese kandidátského genu s použitím genové fúze ke konstitutivnímu promotoru, například, ale ne pouze, 35S; a inducibilní exprese. Kódující oblast kandidátského genu je připojena ve čtecím rámci k 35S promotoru a výsledný konstrukt je klonován do binárního expresního vektoru pGA482. Kandidátské regulační geny o plné délce (tzn. kandidátské geny obklopené 5' a 3' oblastmi, které jsou lokalizovány do jednoho nebo více zde identifikovaných QTL lokusů) spolu s přibližně 1kb dlouhými 5' - a 1kb dlouhými 3' - nekódujícími oblastmi, jsou klonovány do binárního expresního vektoru pGA482. Konstrukty obsahující překládanou sekvenci pro jak konstitutivní tak inducibilní expresi jsou použity k transformaci rostlin, které nemají alelu v QTL odpovídající expresi zkoumaného znaku (například, ale ne pouze, expresi *msaCI*).

genu) a konstrukty obsahující komplementární sekvenci k sekvenci překládané jsou použity k transformování rostlin, které obsahují alelu v tomto QTL. Transgenní rostliny jsou pěstovány a vystaveny chladovým aklimatizačním podmínkám, což je potřeba pro určení vlivu vnesených překládaných nebo k překládaným sekvencím komplementárních sekvencí genů na expresi jednoho nebo více msaCI genů a na LT_{50} . Tím se potvrdí kandidátský gen jako regulační faktor kontrolující mRNA expresi msaCI genů v oblasti QTL.

Všechny reference, které jsou uvedeny výše, jsou zde zahrnuty tímto odkazem.

Vynález byl popsán s ohledem na výhodná provedení vynálezu. Nicméně, odborníkům bude jasné, že lze provést celou řadu odchylek a modifikací, aniž by došlo k odklonu od oblasti vynálezu tak, jak zde byl popsán.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob identifikace jedné nebo více oblastí v genomu zkoumaného organismu, které zprostředkovávají expresi jednoho nebo více zkoumaných genů obsahující:
 - i) identifikaci prvního zkoumaného organismu charakterizovaného tím, že tento zkoumaný organismus vykazuje měřitelnou odpověď na podnět prostředí, nebo jinak vykazuje fenotyp spojený se změněnou genovou expresí spojenou se zkoumaným procesem;
 - ii) identifikaci druhého zkoumaného organismu charakterizovaného tím, že zkoumaný druhý organismus:
 - a) postrádá nebo nevykazuje tak silnou odpověď na podnět, jako u prvního zkoumaného organismu;
 - b) při srovnání s prvním zkoumaným organismem vykazuje rozdílný fenotyp, přičemž rozdílný fenotyp je spojený se zkoumaným procesem;
 - c) vykazuje zkoumaný fenotyp, který se segreguje v populaci vznikající křížením prvního zkoumaného organismu;
 - d) nebo je kombinací dvou nebo více z bodů a), b), c) a d);
 - iii) křížení prvního a druhého zkoumaného organismu s cílem produkovat populaci segregujícího potomstva;
 - iv) extrahování RNA z každého segregujícího potomstva a kvantifikace hladiny genové exprese jednoho nebo více zkoumaných genů, kde jeden nebo více zkoumaných genů jsou spojeny s odpovědí na podnět prostředí nebo zkoumaný proces;
 - v) příprava mapy vazeb segregujícího potomstva s použitím jednoho nebo více markerů;
 - vi) určení vztahu mezi jedním nebo více markery na mapě vazeb a genovou expresí jednoho nebo více zkoumaných genů a identifikaci jednoho nebo více lokusů kvantitativního znaku (QTL).
2. Způsob podle nároku 1, kde po kroku křížení (krok iii)), a před krokem extrakce RNA, je segregující potomstvo vystaveno požadovanému podnětu prostředí nebo je charakterizováno jako nacházející se ve specifické vývojové fázi.

3. Způsob podle nároku 1, kde metoda je použita pro identifikaci jednoho nebo více QTL lokusů shodujících se s transkripčním faktorem nebo jakýmkoli faktorem řídícím expresi jednoho nebo více zkoumaných genů.
4. Způsob podle nároku 1, kde po kroku určení vztahu (krok vi)) je izolován a charakterizován jeden nebo více genů umístěných v jednom nebo více QTL lokusech.
5. Způsob podle nároku 1, kde v krocích identifikaci (kroky i) a ii)) je podnět prostředí nebo zkoumaný proces vybrán ze skupiny obsahující:
 - biotický stres;
 - abiotický stres;
 - změnu minerální výživy;
 - změnu v kvalitě světla nebo světelného toku;
 - odpověď vyvolaná přidáním jedné nebo více exogenních chemikálií;
 - jakýkoli stres, který vede ke změně úrovně endogenních chemických látek u rostliny;
 - vývojové, chemické nebo enviromentální řízení genové exprese během embryogeneze;
 - organogeneze;
 - stárnutí;
 - dozrávání;
 - období klidu;
 - klíčení;
 - cirkadiánní, ultradiánní a další vnitřní rytmy;
 - dosažitelný výtěžek;
 - tvorba semen;
 - fotosyntetická translokace;
 - změny v kapacitě spotřeby a zdroje uvedené rostliny;
 - změny v indexu listové plochy;
 - změny v poměru podzemních a nadzemních částí rostliny;
 - změny v nutriční hodnotě sklizeného materiálu;
 - změny v morfologii rostliny;
 - změny v rychlosti buněčného cyklu;
 - změny v rychlosti buněčné diferenciaci;
 - změny ve velikosti buněk;

- změny v životním cyklu rostliny; a
 - genomové přeskupování.
6. Způsob podle nároku 1, kde v kroku určení (krok vi)) je identifikován marker v QTL lokusu.
 7. Použití markeru podle nároku 6 pro sledování potomstva určitého organismu.
 8. Použití markeru podle nároku 6 pro určení hybridnosti určitého organismu.
 9. Použití markeru podle nároku 6 pro identifikaci odchylky souvisejícího fenotypového a/nebo expresního znaku.
 10. Použití markeru podle nároku 6 pro konstrukci genetické mapy.
 11. Použití markeru podle nároku 6 pro identifikaci individuálního potomstva křížení.
 12. Použití markeru podle nároku 6, kde marker je DNA marker, a daný DNA marker je použit pro izolaci genomových DNA sekvencí obklopujících DNA sekvenci gen kódující nebo gen nekódující.
 13. Použití markeru podle nároku 12, kde daná genomová sekvence je promotor nebo regulační sekvence.
 14. Použití markeru podle nároku 6 pro selekci s pomocí markeru, klonování založené na mapování, potvrzení hybridnosti, určení „fingerprintingu“, genotypizaci, jako pro alelu specifického markeru, nebo jako kombinaci daných možností.
 15. Použití markeru podle nároku 6 u rostlin.
 16. Způsob identifikace regulačního genu, který zprostředkuje expresi zkoumaného genu obsahující:
 - i) identifikaci jednoho nebo více lokusů kvantitativních znaků (QTL), které vysvětlují podstatnou část odchylek v expresi jednoho nebo více zkoumaných genů;
 - ii) mapování jednoho nebo více regulačních genů;
 - iii) určení, zda jeden nebo více regulačních genů jsou lokalizovány do oblasti jednoho nebo více QTL lokusů;
 - iv) izolaci jednoho nebo více regulačních genů uvnitř jednoho nebo více QTL lokusů; a
 - v) sekvenování jednoho nebo více regulačních genů izolovaných v kroku iv).

17. Způsob identifikace regulačního genu, který zprostředkuje expresi zkoumaného genu, sestávající z:

- i) identifikace jednoho nebo více lokusů kvantitativního znaku (QTL), který vysvětluje podstatnou část odchylek v expresi jednoho nebo více zkoumaných genů; a
- ii) izolaci jednoho nebo více regulačních genů uvnitř jednoho nebo více QTL lokusů.
- iii) sekvenování regulačního genu.

18. Způsob identifikace regulační sekvence, která zprostředkovává expresi zkoumaného genu, sestávající z:

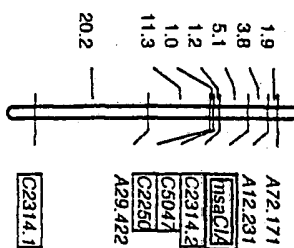
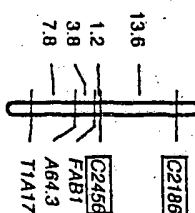
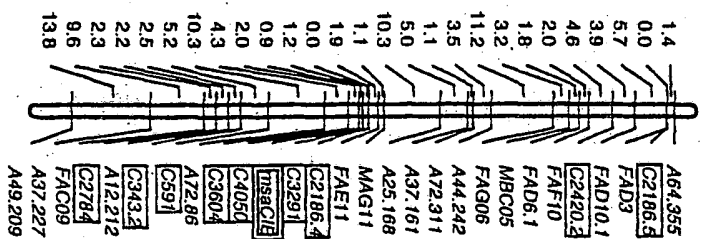
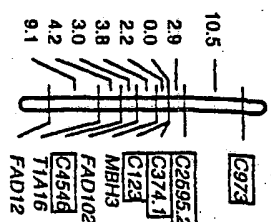
- i) identifikace jednoho nebo více lokusů kvantitativního znaku (QTL), které vysvětluje podstatnou část odchylek v expresi jednoho nebo více zkoumaných genů;
- ii) mapování jednoho nebo více regulačních genů;
- iii) určení, zda tento jeden nebo více regulačních genů je lokalizován do oblasti jednoho nebo více QTL;
- iv) izolaci jednoho nebo více regulačních genů uvnitř jednoho nebo více QTL lokusů; a
- v) sekvenování jednoho nebo více regulačních genů spolu s regulačními sekvencemi jednoho nebo více regulačních genů izolovaných v kroku iv).

19. Způsob identifikace regulační sekvence, která zprostředkuje expresi zkoumaného genu, sestávající z:

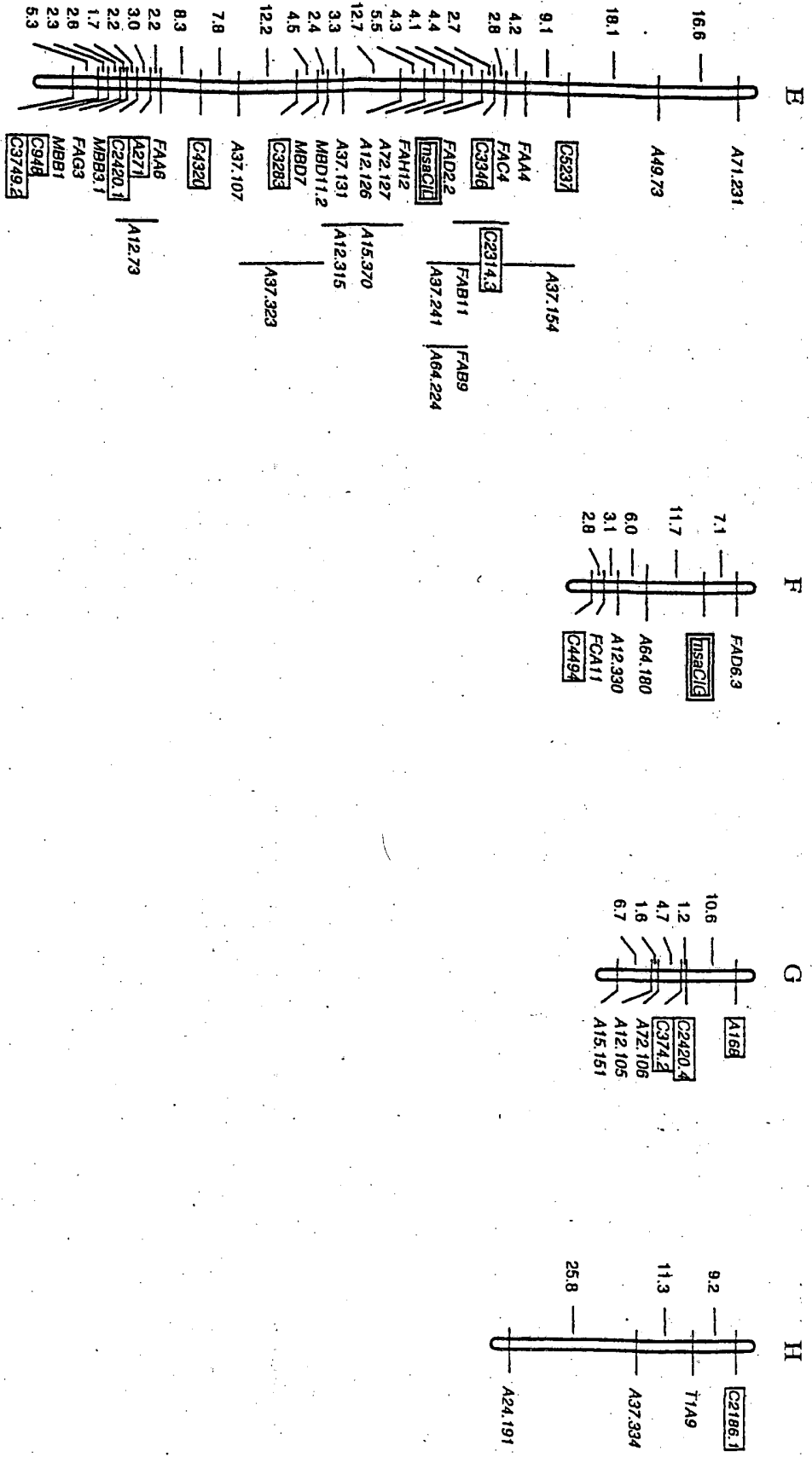
- i) identifikace jednoho nebo více lokusů kvantitativního znaku (QTL), které vysvětluje podstatnou část odchylek v expresi jednoho nebo více zkoumaných genů; a
- ii) izolaci jednoho nebo více regulačních genů uvnitř jednoho nebo více QTL lokusů.
- iii) sekvenování regulačních genů včetně regulačními sekvencemi.

20. Způsob zprostředkování odpovědi zkoumaného organismu na podnět prostředí obsahující transformaci zkoumaného organismu regulačním genem, který byl identifikován způsobem podle nároku 16.

21. Způsob zprostředkování odpovědi zkoumaného organismu na podnět prostředí obsahující transformaci zkoumaného organismu pomocí regulačního genu, který byl identifikován způsobem podle nároku 17.
22. Způsob zprostředkování vývoje zkoumaného organismu obsahující transformaci zkoumaného organismu regulačním genem, který byl identifikován způsobem podle nároku 16.
23. Způsob zprostředkování vývoje zkoumaného organismu obsahující transformaci zkoumaného organismu regulačním genem, který byl identifikován způsobem podle nároku 17.
24. Způsob zprostředkování odpovědi zkoumaného organismu na podnět prostředí obsahující transformaci zkoumaného organismu regulační sekvencí, která byla identifikována způsobem podle nároku 18, napojené ke zkoumanému genu.
25. Způsob zprostředkování odpovědi zkoumaného organismu na podnět prostředí obsahující transformaci zkoumaného organismu regulační sekvencí, která byla identifikována způsobem podle nároku 19, napojené ke zkoumanému genu.
26. Způsob zprostředkování vývoje zkoumaného organismu obsahující transformaci zkoumaného organismu regulační sekvencí, která byla identifikována způsobem podle nároku 18, napojené ke zkoumanému genu.
27. Způsob zprostředkování vývoje zkoumaného organismu obsahující transformaci zkoumaného organismu regulační sekvencí, která byla identifikována způsobem podle nároku 19, napojené ke zkoumanému genu.
28. Způsob podle nároku 16, kde krok izolace zahrnuje získání regulačního genu s použitím pozičního klonování.
29. Způsob podle nároku 17, kde krok izolace zahrnuje získání regulačního genu s použitím pozičního klonování.
30. Způsob podle nároku 18, kde krok izolace zahrnuje získání regulační sekvence s použitím pozičního klonování.
31. Způsob podle nároku 19, kde krok izolace zahrnuje získání regulační sekvence s použitím pozičního klonování.

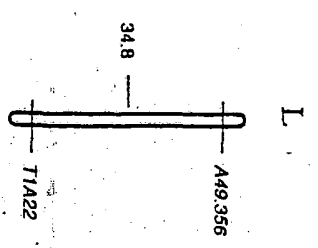
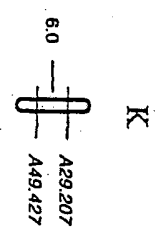
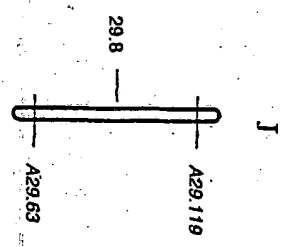
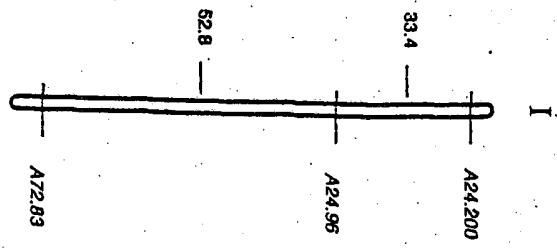


1/13



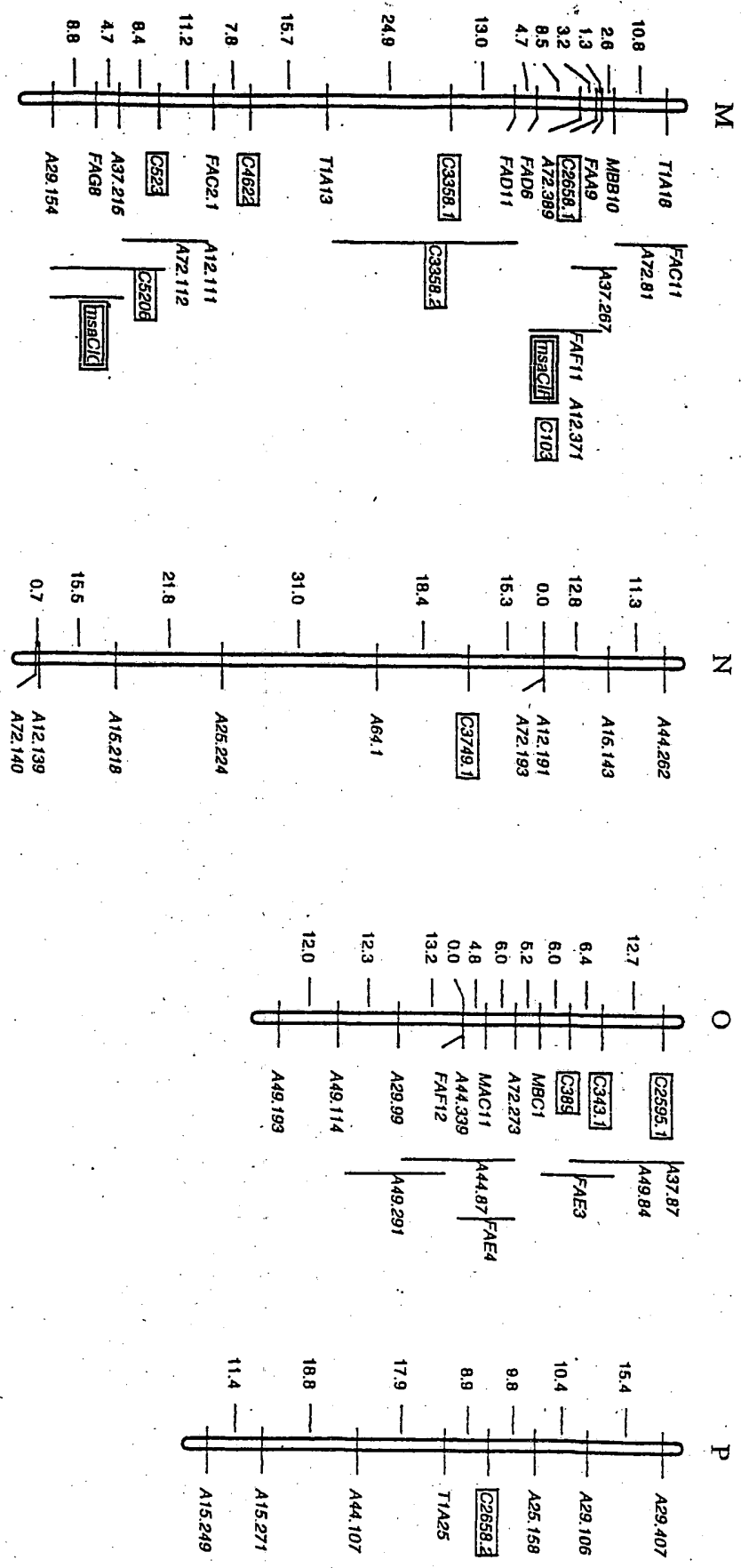
Obr. 1 (pokračování)

PV 2003-146
00.00.00



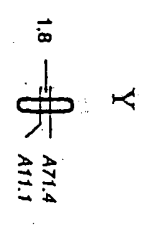
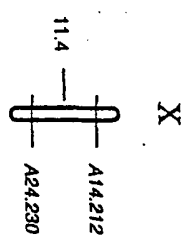
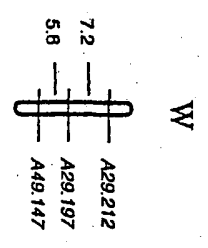
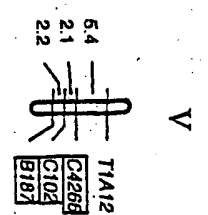
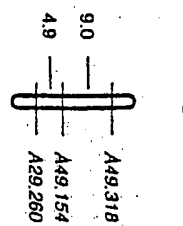
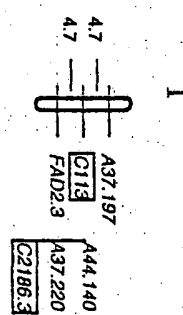
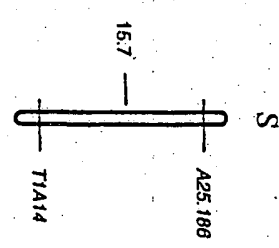
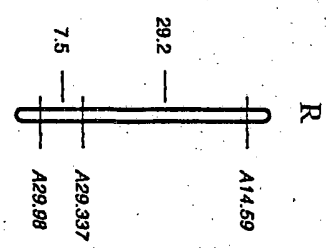
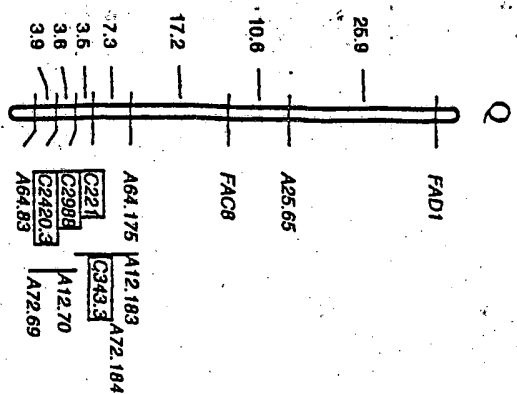
Obr. 1 (pokračování)

941-2002 146



Obr. 1 (pokračování)

944-5002 22

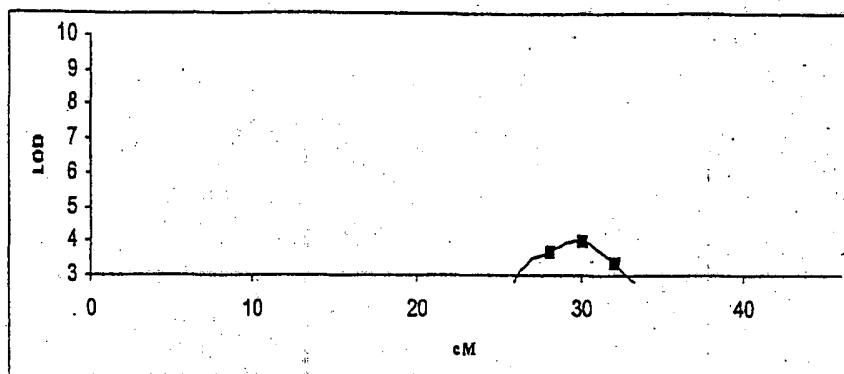


Obr. 1 (pokračování)

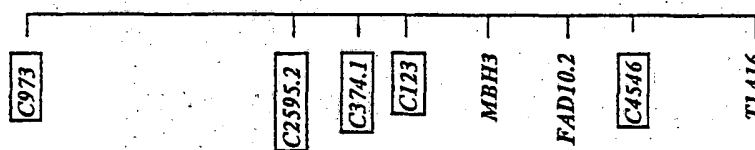
6/13

vazbová skupina A

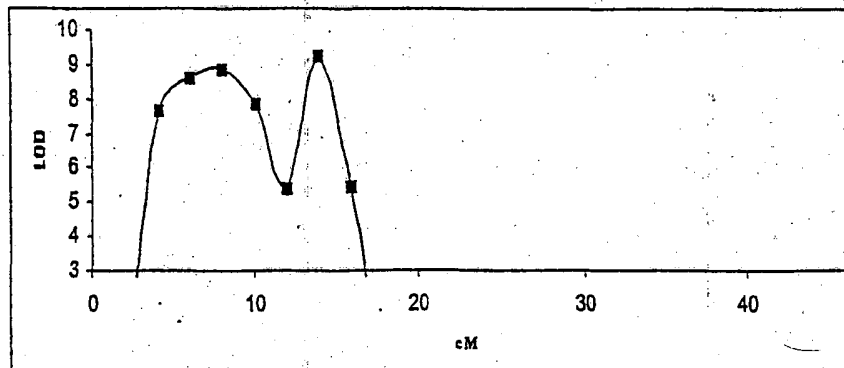
koruna



msaCIC



list

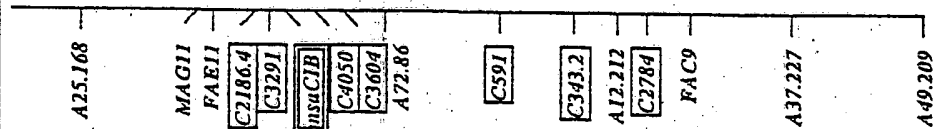
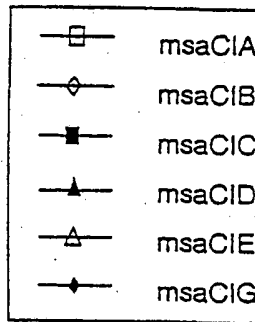
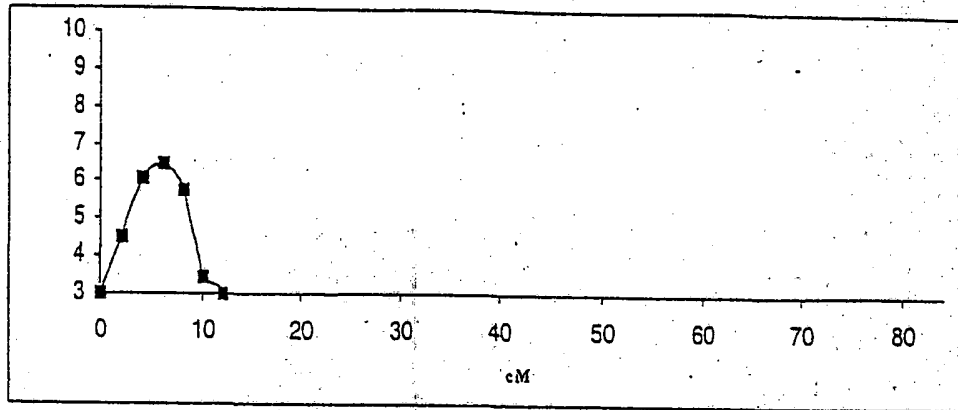


Obr.2

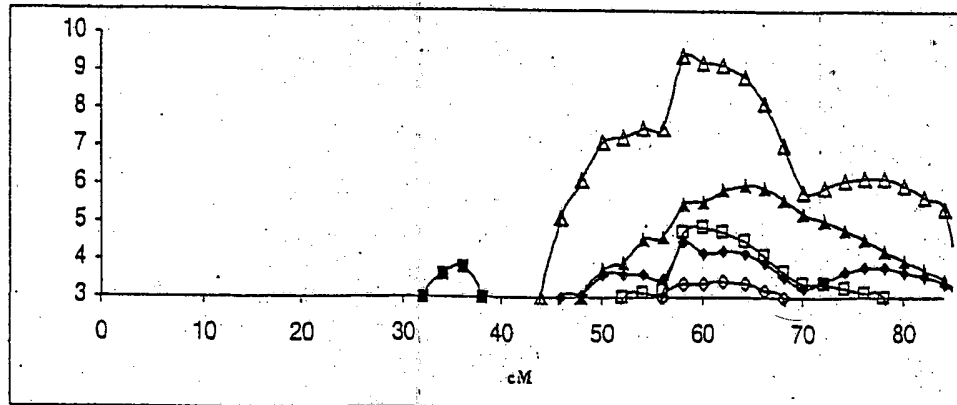
7/13

vazbová skupina B

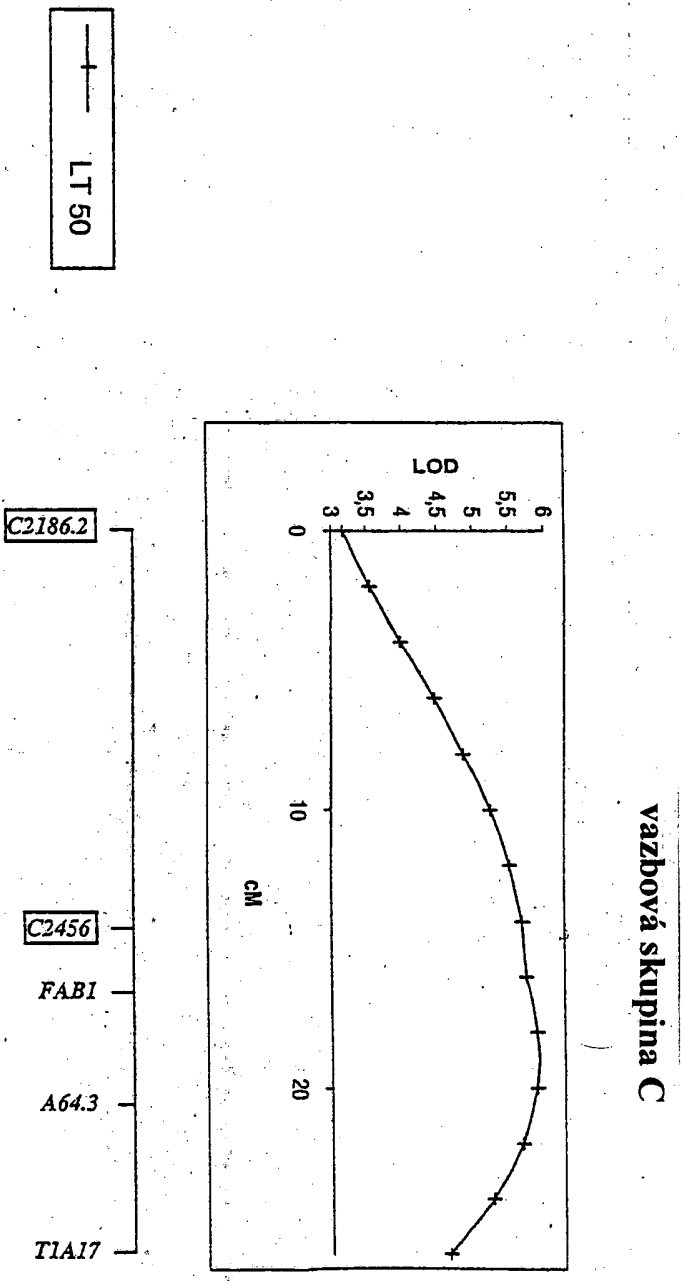
koruna



list



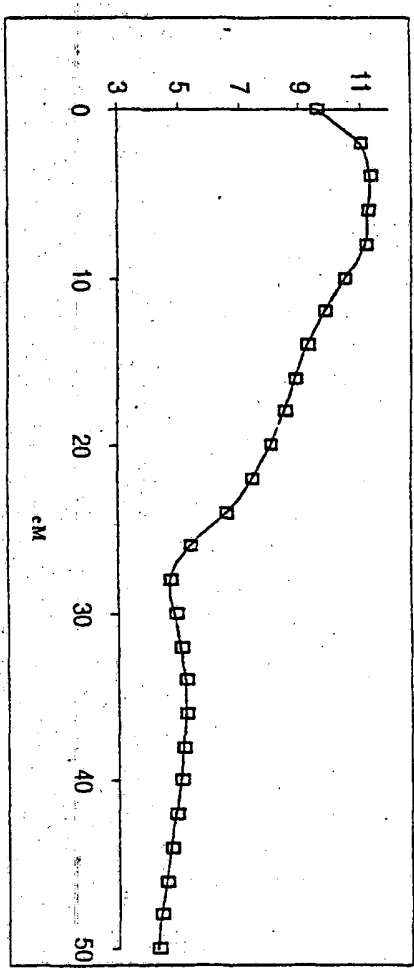
Obr. 2 (pokračování)



Obr. 2 (pokračování)

koruna

vazbová skupina D



msaCIA

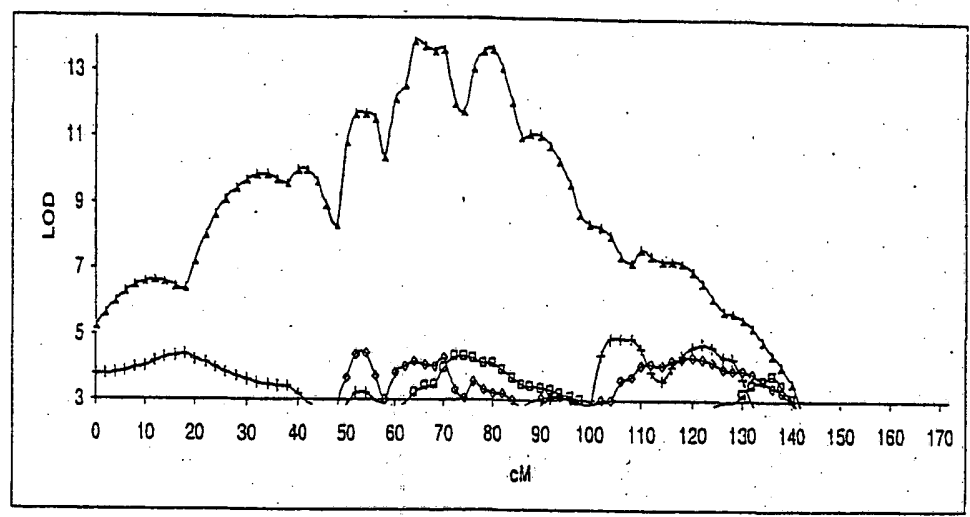
- A72.171
- A12.231
- msaCIA**
- C2314.2
- C5047
- C2250
- A29.422
- C2314.1

Obr. 2 (pokračování)

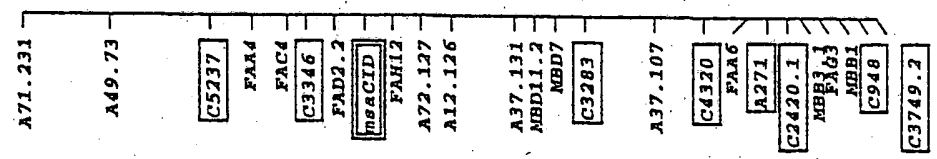
10/13

vazbová skupina E

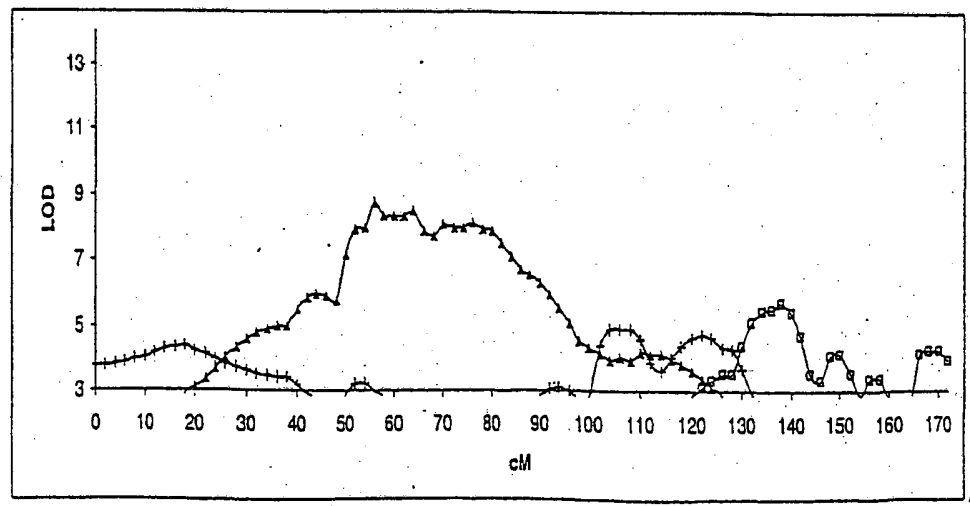
koruna



- +— LT 50
- msaCIA
- ◇— msaCIB
- ▲— msaCID



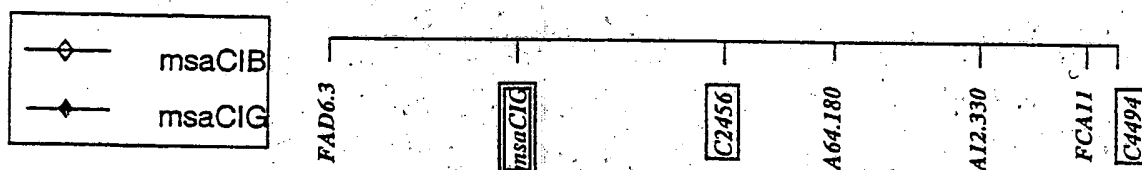
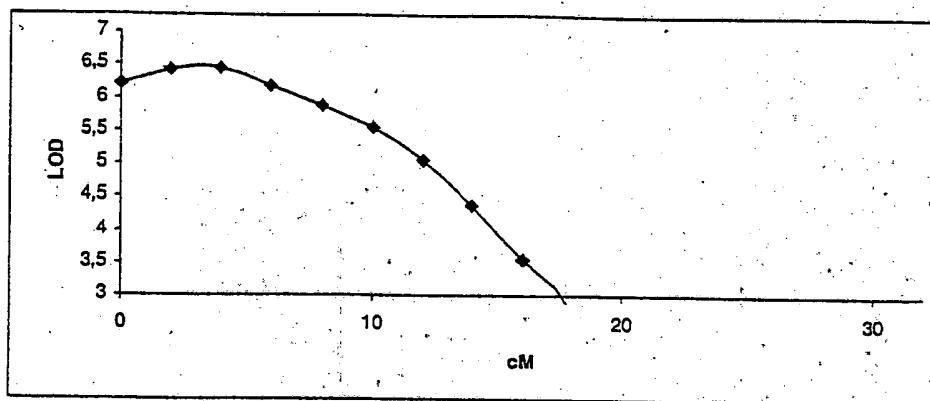
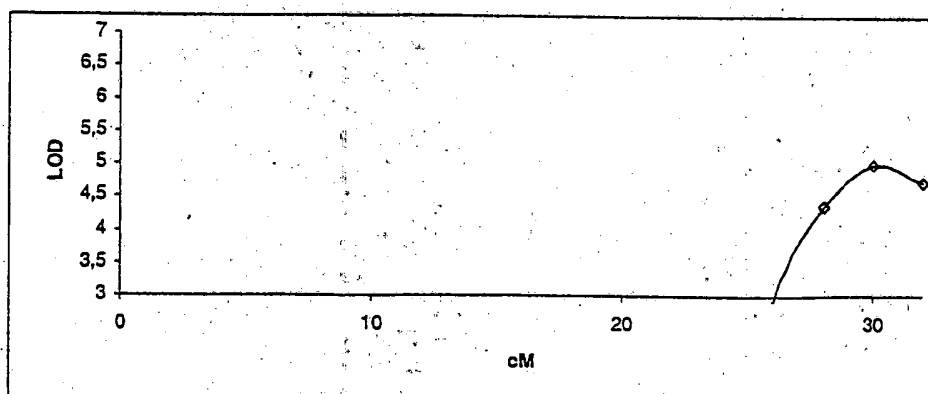
list



Obr. 2 (pokračování)

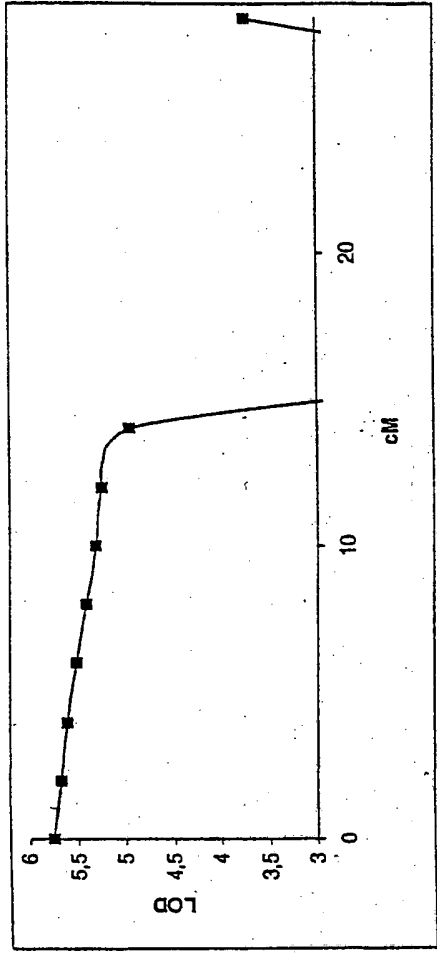
vazbová skupina F

koruna

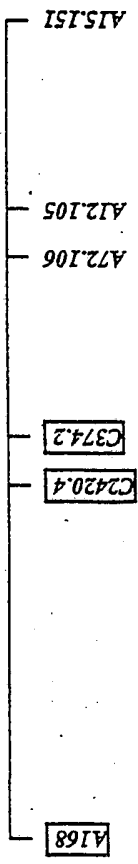
**list**

Obr. 2 (pokračování)

vazbová skupina G



koruna



msaCIC

Obr. 2 (pokračování)

40,54	19,97	48,12	22,00	1,74	55,20	21,28	16,95	54,33	32,78	
34,86	6,51	8,67	14,47	35,08	24,57	15,85	10,00	7,73	57,38	
12,11	10,51	68,11	40,84	72,38	15,88	33,58	11,84	34,56	6,97	3,10
37,58	36,20	32,89	14,63	50,61	8,99	7,60	11,79	3,21	9,69	4,51
49,18	30,42	15,89	59,42	17,58	34,49	18,48	27,66	19,72	12,32	5,46
21,77	11,91	13,45	30,37	27,46	27,65	42,30	17,99	3,23	16,77	
15,52	43,91	26,55	35,52	35,48	11,92	20,92	6,30	19,89	20,13	
	3,99	34,31	24,54	8,41	11,95	46,80	50,37			

Obr. 3