

P01 03902

"A2"



72.348/SZE

## KIVONAT

A SERK-vel kölcsönhatásba lépő fehérjék expressziója által  
biztosított apomixis

A találmány tárgya eljárás egy új növénygeneráció vegetatív reprodukciója valószínűségének növelésére, oly módon, hogy transzgenikusan expresszálnak egy olyan fehérjét kódoló gént, ami a szomatikus embriogenezis receptor-kináz (SERK) által beindított jelátviteli kaszkádban játszik szerepet. Az ebből származó apomiktikus magvak, valamint az ilyen magvak csírázásával kapott növények és azok utódai, valamint a SERK által beindított jelátviteli kaszkádban szerepet játszó fehérjéket kódoló gének is a találmány tárgyát képezik.

"A2"



72.348/SZE

**S.B.G. & K.**  
Nemzetközi  
Szabadalmi Iroda  
H-1062 Budapest, Andrásy út 113.  
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

A SERK-kel kölcsönhatásba lépő fehérjék expressziója által  
biztosított apomixis

A jelen találmány tárgya a növények és növénysejtek vegetatív reprodukciójával kapcsolatos. Pontosabban, a jelen találmány tárgya eljárás a vegetatív reprodukció *in vivo* valószínűségének növelésére magok útján, vagy *in vitro*, szomatikus embriogenezissel. Az ebből származó apomiktikus magvak, valamint az ilyen magvak csíráztatásával kapott növények és azok utódai szintén a jelen találmány tárgyát képezik.

A magokon keresztül történő vegetatív, aszexuális reprodukció, amit neveznek apomixisnek is, a növények egy genetikailag szabályozott reprodukciós mechanizmusa, amit néhány poliploid, természetbe nem vont fajnál lehet megtalálni. Az apomixis két típusát lehet megkülönböztetni, a gametofitást és a nem-gametofitást. A gametofitást apomixisben – amiből szintén kettő van, az apospórást és a diplospórást – több embriózacska keletkezik, amikből tipikus esetben hiányoznak az antipód sejtmagok, vagy az embriózacskaiban megasporogenezis játszódik le. A nem-gametofitást apomixisben, amit esetleges magzatképződés-



nek is neveznek, szomatikus embrió fejlődik ki közvetlenül az embriózacskó, a magház fal vagy burok sejtjeiből. A környező sejtekből származó szomatikus embriók behatolnak az ivaros magházba, a szomatikus embriók közül az egyik kiszorítja a többi szomatikus embriót és az ivaros embriót, majd felhasználja a termelt endospermát.

Ha az apomixist szabályozható, reprodukálhatóbb tulajdonsággá alakítjuk át biotechnológiai módszerekkel, akkor ennek számos előnye lehet a növény nemesítésében és a kultúrnövényváltozatok kifejlesztésében, azokban az esetekben, amikben ivaros szaporodásra képes növények elérhetők, az apomiktikus növényvel való keresztezéshez. A szomatikus embriogenezis receptor kinázról (SERK) ismert, hogy szerepe van az apomiktikus magvából származó sporofita sejtekből keletkező kívülálló embriók képződésében.

Az apomixis a valódi nemesítéshez magról szaporodó hibrideket szolgáltathat. Emellett az apomixis lerövidítheti és egyszerűsítheti a nemesítési folyamatot, oly módon, hogy egy kívánt génkombináció előállításában és/vagy stabilizálásában az önbeporzás és az utódok vizsgálata eliminálható. Az apomixis az egyedi génkombinációt tartalmazó genotípusok kultúrnövényváltozatként való használatához járulhat hozzá, mivel az apomiktikus genotípusok változatlanul szaporodnak, a heterozigóztól függetlenül. A gének vagy a géncsoportok tehát lehetnek „piramisosak” vagy „fixáltak” a szuper genotípusokban. Mindegyik, ivaros-apomiktikus keresztezésből származó, kiváló tulajdonságú



apomiktikus genotípusból lehet kultúrnövény-változat. Az apomixis lehetővé teszi a növénynemesítők számára, hogy stabil jellemzőkkel, azaz például magassággal, mag- és takarmányozási tulajdonságokkal és érettséggel rendelkező kultúrnövény-változatokat fejlesszenek ki.

A hibridek kereskedelmi mennyiségben való előállítására során a nemesítőket nem korlátozza (i) egy citoplazma-sejtmag kölcsönhatás a steril nőivarú szülők létrehozásában, vagy (ii) egy beporzó termékenységét visszaállító kapacitása. Majdnem mindegyik keresztbe kompatibilis csíraplazma lehet potenciális szülő az apomiktikus hibridek előállítására során.

Az apomixis leegyszerűsítheti a hibrid magok kereskedelmi mennyiségben való előállítását is. Pontosabban, (i) nincs szükség a kereskedelmi forgalomba kerülő hibrideket termelő táblák fizikai izolálására; (ii) minden rendelkezésre álló terület használható a hibrid magvak előállítására, ahelyett, hogy meg kellene osztani a területet a beporzók és a hímsteril vonalak között; és (iii) nincs szükség kiindulási szülővonalak fenntartására.

Az apomiktikus úton előállított magvak előállításából felhalmozódó potenciális előnyöket jelenleg nem realizálják, nagymértékben azért, mert problematikus az apomiktikus kapacitás biotechnológiai módszerekkel való bevitelének a számunkra érdekes növényekbe. A jelen találmánynak a SERK által beindított jelátadási kaszkádban szerepet játszó fehérjék bejuttatására vonatkozó kitanítása egy további lépést biztosít ennek a problémának a megoldására, amennyiben *in vivo* javítja a magvakon keresztül



lejátszódó vegetatív reprodukciót, *in vitro* pedig a szomatikus embriogenezist.

Az alábbiakban a „gén” szakkifejezés jelentése kódoló szekvencia és hozzá kapcsolódó szabályozó-szekvenciák. A kódoló szekvencia RNS-sé íródik át, ami a gén típusától függően lehet mRNS, tRNS, rRNS, snRNS, értelmes RNS vagy antiszensz RNS. A szabályozó-szekvencia lehet például promoter szekvencia, 5' és 3' nem-transzlálódó szekvencia és terminációs szekvencia. Más elemek is lehetnek még jelen, mint például intronok.

A „promoter” egy olyan DNS szekvencia, ami beindítja egy hozzá kapcsolódó DNS szekvencia transzkripcióját. A specifikus promoter régiótól függően tartalmazhat olyan elemeket is, amik a génexpresszió szabályozóiként működnek, mint például az aktivátorok, fokozók és/vagy represszorok.

Egy szabályozó DNS szekvenciáról, azaz például egy promoterről akkor mondjuk, hogy „működés szempontjából kapcsolt”, vagy „kapcsolódik” egy RNS-t vagy fehérjét kódoló DNS szekvenciához, ha a két szekvencia egymáshoz viszonyítva úgy van elhelyezve, hogy a szabályozó DNS szekvencia befolyásolja a kódoló DNS szekvencia expresszióját.

Az „expresszió” szakkifejezés jelentése egy endogén gén vagy transzgén transzkripciójára és/vagy transzlációjára utal növényekben.

Az expresszió az „embriózacskó közelében” szakkifejezés jelentése szerintünk termőlevélben, magburokban, magkezdeményben, első magkezdeményben, magház falban, chalazában,



magdudorbélben, szálban vagy maglécben való expresszió. A szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy a „magburok” szakkifejezés vonatkozik azokra a szövetekre is, amik abból származnak, mint például az endotéliumra. Az „embriogenikus” szakkifejezés a sejtnak azt a képességét definiálja, hogy permisszív körülmények között embrióvá fejlődik. Az nyilvánvaló, hogy az „aktív formában” szakkifejezés olyan fehérjékre vonatkozik, amik csonkítva, vagy más módon mutáltatva vannak, azzal a feltétellel, hogy még mindig növelik a vegetatív reprodukció valószínűségét, függetlenül attól, hogy ezt teszik-e vagy sem, kölcsönhatásba lépnek a jelátvitel komponenseivel, ugyanúgy, mint ahogy azt azokban a szövetekben teszik, amikben normális körülmények között előfordulnak.

A „marker gének” egy szelektálható vagy szűrhető tulajdonságot kódolnak. Tehát a „szelektációs marker gén” expressziója egy sejtnak szelektív előnyt biztosít, ami annak a következménye, hogy egy nem-transzformált sejttel összehasonlítva képes egy negatív szelektációs ágens, azaz például egy antibiotikum vagy herbicid jelenlétében növekedni. A nem-transzformált sejtekkel összehasonlítva a transzformált sejtek által birtokolt szelektív előny annak is lehet a következménye, hogy képes egy hozzáadott vegyületet tápanyagként, növekedési faktorként vagy energiaforrásként hasznosítani. A szelektációs marker gén szakkifejezés olyan génre vagy génkombinációra is vonatkozik, amiknek növénysejtekben való expressziója a sejtnak mindkét, azaz a negatív és pozitív szelektációs előnyt képes biztosítani. Egy másik megoldás sze-



rint viszont, a „szűrhető szelekciós marker gén” nem biztosít szelektív előnyt a transzformált sejteknek, de expressziója a transzformált sejteket fenotípusosan megkülönböztethetővé teszi a nem-transzformált sejtektől.

A „növény” szakkifejezés bármilyen növényre vonatkozik, de főleg magos növényekre.

A „növénysejt” szakkifejezés a növény strukturális és fiziológiai egységére vonatkozik, ami tartalmaz protoplasztot és sejtfalat. A növénysejt lehet izolált egyedi sejt (azaz például levélrész-őrsejt), vagy tenyésztett sejt, vagy egy magasabban szervezett egység, azaz például növényi szövet vagy növényi szervezet része.

A „növényi anyag” szakkifejezés jelentése levelek, szárak, gyökerek, hajszálgökerek, virágok vagy virágok részei, szirmok, gyümölcsök, virágpór, pollencső, portok fonalak, magrügyek, embriózacskók, csírasejtek, magházak, zigóták, embriók, zigotikus embriók *per se*, hipokotil szekciók, apikális merisztémák, vaszkuláris kötegek, periciklusok, magvak, dugványok, sejt- vagy szövettenyészetek vagy a növény bármilyen része vagy terméke.

A jelen találmányban az alábbi megoldásokat adjuk meg:

- eljárás egy új növénygeneráció vegetatív reprodukciója valószínűségének növelésére, azzal jellemezve, hogy transzgenikusan expresszálunk egy gént, ami a szomatikus embriogenezis receptor kináz (SERK) által beindított jelátviteli kaskádban szerepet játszó fehérjét kódol;
- az előzőekben említett eljárás, azzal jellemezve, hogy a kódolt fehérje fizikai kölcsönhatásba lép a SERK-vel;



- az előzőkben említett eljárás, azzal jellemezve, hogy a fehérje a Squamosa-promoter kötő fehérje (SBP) transzkripciós faktorok, vagy a 14-3-3 típusú lambda fehérjék családjának tagja;
- az előzőkben említett eljárás, azzal jellemezve, hogy a fehérje aminosav szekvenciáját a 2. számú szekvenciavázlatban, a 4. számú szekvenciavázlatban, a 6. számú szekvenciavázlatban, a 8. számú szekvenciavázlatban, a 10. számú szekvenciavázlatban, a 12. számú szekvenciavázlatban, a 14. számú szekvenciavázlatban vagy a 16. számú szekvenciavázlatban mutatjuk be, vagy aminosav szekvenciája tartalmaz egy legalább 150 aminosavból álló komponens szekvenciát, ami az illesztés után legalább 40%-os azonosságot mutat a 12. számú szekvenciával vagy a 16. számú szekvenciával;
- az előzőkben említett eljárás, azzal jellemezve, hogy a magvakon keresztül fokozzuk a vegetatív reprodukció (apomixis) valószínűségét;
- az előzőkben említett eljárás, azzal jellemezve, hogy a magvak nem-gametofítás apomixisből származnak;
- az előzőkben említett eljárás, azzal jellemezve, hogy a kódolt fehérjét transzgenikusan expresszáljuk az embriózacskó szomszédságában;
- az előzőkben említett eljárás, azzal jellemezve, hogy növeljük az *in vitro* szomatikus embriogenezis valószínűségét;



- az előzőkben említett eljárás, azzal jellemezve, hogy a gén expresszióját a SERK gén promotere, a répa kitináz DcEP3-1 gén promotere, az *Arabidopsis* AtChitIV gén promotere, az *Arabidopsis* LTP-1 gén promotere, az *Arabidopsis* bel-1 gén promotere, a petúnia fbp-7 gén promotere, az *Arabidopsis* ANT gén promotere, vagy a *Phalaenopsis* O216 gén promotere szabályozza;
- gén, ami a 2. számú szekvenciavázlatban, a 4. számú szekvenciavázlatban, a 6. számú szekvenciavázlatban, a 8. számú szekvenciavázlatban, a 10. számú szekvenciavázlatban, a 12. számú szekvenciavázlatban, a 14. számú szekvenciavázlatban vagy a 16. számú szekvenciavázlatban bemutatott aminosav szekvenciával rendelkező fehérjét kódol, vagy egy olyan fehérjét, aminek aminosav szekvenciája tartalmaz egy legalább 150 aminosavból álló komponens szekvenciát, ami az illesztés után legalább 40%-os azonos-ságot mutat a 12. számú szekvenciával vagy a 16. számú szekvenciával;
- az említett gén, aminek a nukleotid szekvenciáját az 1. számú szekvenciavázlatban, a 3. számú szekvenciavázlatban, az 5. számú szekvenciavázlatban, a 7. számú szekvenciavázlatban, a 9. számú szekvenciavázlatban, a 11. számú szekvenciavázlatban, a 13. számú szekvenciavázlatban vagy a 15. számú szekvenciavázlatban adjuk meg;
- az említett gén, aminek a nukleotid szekvenciáját úgy módosítjuk, hogy az ismert mRNS instabilitási motívumokat vagy



poliadenilezési szignálokat eltávolítjuk, és/vagy azokat a kodonokat használjuk, amiket előnyben részesít az a növény, amibe a DNS-t be akarjuk építeni;

- növény vagy növénysejt, ami transzgenikusan expresszálja az említett gént; és
- növény vagy növénysejt, amit a jelen találmány szerinti eljárással állíthatunk elő elő.

A jelen találmány tárgya eljárás egy új növénygeneráció vegetatív reprodukciója valószínűségének növelésére, például úgy, hogy apomiktikus magvakat állítunk elő, vagy szomatikus embriókat állítunk elő *in vivo* körülmények között, azzal jellemezve, hogy transzgenikusan expresszálunk egy gént, ami a szomatikus embriogenezis receptor kináz (SERK) által beindított jelátviteli kaszkádban szerepet játszó fehérjét kódol. Ezt az alábbi eljárással érjük el:

- a növényi anyagot transzformáljuk az említett fehérjét kódoló nukleotid szekvenciával,
- a transzformált növényi anyagot növényekké, vagy annak termőlevelet tartalmazó részévé transzformáljuk, majd
- a szekvenciát az embriózacsó közelében expresszáljuk.

A jelen találmány egy további megvalósítási módja olyan génekre vonatkozik, amik a szomatikus embriogenezis receptor kináz (SERK) által beindított jelátviteli kaszkádban szerepet játszó fehérjét kódolnak, aminek egy aktív formában való jelenléte



egy sejtben, vagy annak membránjában az említett sejtet embriogénné teszi.

Az expresszálandó gén előnyösen egy olyan fehérjét kódol, ami fizikai kölcsönhatásba lép a SERK-vel. A SERK-vel kölcsönhatásba kerülő fehérjék specifikus példái a Squamosa-promoter kötő fehérje transzkripciós faktorok [Klein és mtsai: *Molecular and General Genetics* 250, 7-16 (1996)]. Ezek a fehérjék képesek specifikus kölcsönhatásba lépni a DNS-sel, egy 70-90, előnyösen 79 aminosavból álló konzerválódott doménen, az SBP boxon keresztül. A különböző SBP-box szekvenciák általában 50%-os, előnyösen több mint 60%-os, vagy több mint 70%-os szekvenciaazonosságot mutatnak. Az SBP-boxban a cisztein és hisztidin csoportok figyelemre méltó elrendezése látható, ami emlékeztet a cink-ujjakra, és valószínűleg szerepet játszik a specifikus promoter-elemek felismerésében. Egy kétrészes nukleáris lokalizációs szignál található az SBP-box C-terminálisán [Dingwall és mtsai: *Trends in Biochem. Sci.* 16, 478-481 (1991)]. A SERK-vel kölcsönhatásba lépő SBP fehérjének mind az N-terminális, mind a C-terminális doménjei nagyon variábilisak, és valószínűleg szerepet játszanak a fehérje aktivitásának szabályozásában. Az egyik lehetséges SBP fehérje azonos az SPL3-mal (5. számú szekvencia és 6. számú szekvencia), ami a virág tranzícióban játszik szerepet, és a fejlődő virágrügyekben expresszálódik [Cardon és mtsai: *Plant Journal* 12, 367-377 (1997)].

A SERK-vel kölcsönhatásba lépő fehérjék egy másik csoportja a 14-3-3 fehérjék családjának izoformáiból áll, amilyen



például a 14-3-3 típusú lambda fehérje [Wu és mtsai: *Plant Physiology* 114, 1421-1431 (1997); 9. számú szekvencia és 10. számú szekvencia]. Összesen 10 különböző 14-3-3 fehérje van jelen *Arabidopsis*-ban, és a különböző tagok az intracelluláris jelátvitelben játszanak szerepet. Úgy befolyásolják a jelátvitelt, hogy a specifikus motívumokon (amiket például az olyan konzerválódott aminosav szekvenciák reprezentálnak, mint az RxxS(p)xP) a foszfoszerint tartalmazó fehérjékhez kötődnek [Yaffe és mtsai: *Cell* 91, 961-971 (1997)]. Egy feltételezett 14-3-3 kölcsönhatás domént, aminek a szekvenciája RPPSQP, megtalálták az *Arabidopsis* SERK fehérje 391-396-os pozíciójában, valamint a *Daucus carota* SERK fehérje ennek megfelelő illesztett régiójában, aminek aminosav szekvenciája RQPSEP, ami a SERK-et egy mechanizmussal látja el egy 14-3-3 közvetített jelátvitelhez.

A SERK-kel kölcsönhatásba lépő fehérjék egyik példája a 11. számú szekvenciavázlaton (és a 12. számú szekvenciavázlaton) látható, egy másik példáját pedig a szakirodalomban ismertették [Century és mtsai: *Science* 278, 1963-1965 (1997)]. Az NDR1 valószínűleg egy membránhoz kapcsolódó komponenst kódol a jelátviteli bioszintézis útban, a patogént felismerő fehérjék után. Azt javasolták, hogy az NDR1 egy olyan fehérje lehet, ami számos különböző receptorral lép kölcsönhatásba. A 6. számú szekvenciavázlat egy új tagot reprezentál ebben a kis fehérjecsaládban, amiről feltételezik, hogy a transzmembrán receptorok által befolyásolt intracelluláris jelátvitelben játszik szerepet.



A 13. számú szekvencia egy SERK-kel kölcsönhatásba lépő fehérjét (14. számú szekvencia) kódol, ami homológ az *Escherichia coli* aminopeptidáz N-nel, és feltételezik, hogy egy *Arabidopsis* proteázt kódol, ami kölcsönhatásba lép a SERK-kel, vagy aktiválja a SERK.

A 15. számú szekvenciának megfelelő, SERK-kel kölcsönhatásba lépő fehérje kikövetkeztetett aminosav szekvenciája (16. számú szekvencia) nem mutat homológiát ismert géntermékekkel, bár létezik a rokon géntermékeknek egy kicsi, még le nem írt családja *Arabidopsis*-ban.

Amennyiben az előzőkben említett, SERK-kel kölcsönhatásba lépő fehérjék, és a nekik megfelelő gének újak, a jelen találmány tárgyát képezik.

Természetesen az előzőkben ismertetett génekhez hasonló gének is használhatók. A hasonló gén egy olyan gén, aminek a nukleotid szekvenciája komplementer a vizsgált szekvenciával és képes hibridizálódni a találmány szerint szekvenciához. Ha a vizsgált és a találmány szerint szekvencia kétszálú DNS-t képez, akkor a vizsgált szekvenciát alkotó nukleinsav olvadáspontja a találmány szerinti szekvencia olvadáspontjától kevesebb mint 20 °C-szal tér el. Abban az esetben, amikor a vizsgált és a találmány szerinti szekvencia össze van keverve, és egyszerre vannak denaturálva, a szekvenciák olvadáspontja előnyösen 10 °C-szal kevesebbrel tér el egymástól. Az a legelőnyösebb, ha a hibridizációt szigorú körülmények között hajtjuk végre, vagy a találmány szerinti, vagy a vizsgált DNS-t rögzítve. Eszerint a denaturált vizs-

gált, vagy találmány szerinti szekvenciát előnyösen először egy hordozóhoz rögzítjük, majd a hibridizációt előre meghatározott ideig végezzük, 50-70 °C közötti hőmérsékleten, dupla erősségű citrát pufferrel pufferelt sóoldatban (SSC), ami 0,1 % SDS-t tartalmaz, majd a hordozót ugyanazon a hőmérsékleten mossuk egy olyan pufferrel, ami kisebb koncentrációjú SSC-t tartalmaz. A megkívánt szigorúsági mértéktől, és ennek megfelelően a szekvenciák hasonlóságától függően, egy adott hőmérsékleten - azaz például 60 °C-on - az ilyen csökkent koncentrációjú pufferek tipikus esetben 0,1% SDS-t tartalmazó egyszeres erősségű SSC, 0,1% SDS-t tartalmazó fele erősségű SSC, és 0,1% SDS-t tartalmazó, egytized erősségű SSC. Azok a legnagyobb hasonlósággal rendelkező szekvenciák, amiknek a hibridizációját a legkevésbé érinti a csökkent koncentrációjú pufferekkel való mosás. Az a legelőnyösebb, ha a vizsgált és a találmány szerinti szekvenciák olyan hasonlóak, hogy a közöttük lejátszódó hibridizációt lényegében nem érinti a 0,1% SDS-t tartalmazó, egytized erősségű nátrium-citrát pufferrel való mosás.

Az expresszálandó gén módosítható, oly módon, hogy az ismert mRNS instabilitási motívumokat vagy poliadenilezési szignálokat eltávolítjuk, és azokat a kodonokat használjuk, amiket előnyben részesít az a növény, amibe a DNS-t be akarjuk építeni, ennek következtében az így módosított szekvencia expressziója az említett növényben olyan fehérjét eredményez, ami lényegében hasonlít ahhoz, amit a módosítatlan szekvencia expressziójával



kapunk abban a szervezetben, amiben az említett fehérje endogén.

A hasonló funkcióval rendelkező fehérjék szekvencia variabilitása azt sugallja, hogy számos aminosav helyettesíthető, inszertálható vagy kivágható, anélkül hogy megváltoztatnánk a fehérje funkcióját. Az ezek között a fehérjék között fennálló kapcsolatot az egyes fehérjék illesztett aminosav szekvenciái, vagy ezek komponens szekvenciái közötti szekvencia-azonosság mértéke tükrözi.

A dinamikus programozású algoritmusok különböző illeszkedéseket eredményeznek. Általában két megközelítési mód van a szekvenciák illesztésére. A Needleman, Wunsch és Sellers által javasolt algoritmusok két szekvencia teljes hosszára vonatkoznak, ezzel a két szekvencia globális illesztését eredményezik. A Smith-Waterman algoritmus viszont lokális illeszkedéseket eredményez. Egy lokális illeszkedés a szekvenciákon belül azokat a régiókat illeszti egymáshoz, amik a leghasonlóbbak, ha meg lehet választani az eredmény-mátrixot és a rés-büntetések. Ez lehetővé teszi, hogy egy adatbázis keresést a szekvenciák leginkább konzerválódott szekvenciáira fókuszáljunk. Azt is lehetővé teszi, hogy a szekvenciákban a hasonló doméneket azonosítsuk. Ahhoz, hogy felgyorsítsuk az illesztéseket a Smith-Waterman algoritmussal, mind a BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) mind a FASTA további korlátozásokat ad az illesztésekre.

A jelen találmány szövegösszefüggésében az illesztéseket kényelmesen a BLAST használatával hajtjuk végre, ami hason-

lósági programok sorozata, arra tervezve, hogy az összes elérhető szekvencia adatbázist át lehessen vizsgálni vele, függetlenül attól, hogy a keresést fehérjére vagy DNS-re hajtjuk végre. Ennek a kutatási segédeszköznek BLAST 2.0 verzióját (réses BLAST) az Interneten hozzáférhetővé tették (jelenleg: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Heurisztikus algoritmust használ, és a globális illeszkedésekkel szemben lokálisan keres, ezért képes kimutatni a rokonságot azok között a szekvenciák között, amik csak az izolált régiókban azonosak. A BLAST kutatásban adott értékeknek jól definiált statisztikai jelentése van. A jelen találmány oltalmi körében különösen hasznos a blastp program, ami lehetővé teszi, hogy részeket vigyünk be a lokális szekvencia illeszkedésekbe, és a PSI-BLAST program; mindkét program egy aminosav szekvenciát keres egy fehérjeszekvencia adatbázisban, valamint a blastp variáns program, ami csak két szekvencia esetében keresi a lokális illeszkedéseket. Az említett programokat előnyösen alapértékekre beállított opcionális paraméterekkel futtatják.

A BLAST használatával végzett szekvencia illesztések azt is figyelembe tudják venni, hogy egy aminosavnak egy másikkal való helyettesítése valószínűleg megőrzi-e azokat a fizikai és kémiai tulajdonságokat, amik ahhoz szükségesek, hogy a fehérje struktúráját és funkcióját fenntartsuk, vagy valószínűbb, hogy ezzel elrontjuk az esszenciális struktúrális és funkcionális tulajdonságokat. A nem-konzervatív helyettesítések például kis gya-



korisággal fordulnak elő, és a konzervatív helyettesítések az alábbi csoportokba tartozó aminosavak között hajthatók vgre:

- (i) Szerin és treonin;
- (ii) glutaminsav és aszparaginsav;
- (iii) arginin és lizin;
- (iv) aszparagin és glutamin;
- (v) izoleucin, leucin, valin és metionin;
- (vi) fenilalanin, tirozin és triptofán;
- (vii) alanin és glicin.

Az ilyen szekvencia-hasonlóságokat mennyiségileg a pozitív aminosavak százalékában adjuk meg, ami az azonos aminosavak százalékát jelenti, és ez segít abban, hogy egy fehérjét a határ-  
esetekben a helyes fehérjecsaládhoz rendeljünk.

A találmány specifikus megvalósítási módjaiban egy gént expresszálunk, ami egy olyan fehérjét kódol, ami a szomatikus embriogenezis receptor kináz (SERK) fehérje által beindított jelátviteli kaszkádban játszik szerepet, és aminosav szekvenciája a 2., 4., 6. vagy 8. számú szekvenciavázlaton látható, vagy egy ehhez hasonló fehérje. A hasonlóságon azt értjük, hogy egy fehérje tartalmaz egy legalább 150 aminosavból álló szekvencia-komponenst, ami az illesztés elvégzése után legalább 40%-os, és előnyösen 50 vagy nagyobb százalékos szekvencia-azonosságot mutat egy másik fehérjével.

Ahhoz, hogy a szekvenciát expresszáljuk egy regenerált növényben, de főleg annak termőlevelében, szövet-specifikus módon, a szekvencia egy indukálható vagy a fejlődési folyamat által



szabályozott promoter vezérlése alatt áll. Azt részesítjük előnyben, ha a gén az embriózacskó, a magház fal, a magdudorbél vagy a magburok szomatikus sejtjeiben expresszálódik. Ahogy az apomiktikus magban levő endosperma poláris sejtmag és egy pollen eredetű hím gaméta sejtmag fúziójából származik az embriózacskóban, az az előnyös, ha a fehérjét expresszáló szekvencia azelőtt expresszálódik, mielőtt a poláris sejtmag fuzionál a hím gaméta sejtmagjával.

Tipikus esetben a promoter olyan promoter, ami a SERK gének expresszióját *in planta* szabályozza, az *Arabidopsis* ANT gén promotere, a *Phalaenopsis* O216 gén promotere, a répa kitináz DcEP3-1 gén promotere, az *Arabidopsis* AtChitIV gén promotere, az *Arabidopsis* LTP-1 gén promotere, az *Arabidopsis* bel-1 gén promotere, a petúnia fbp-7 gén promotere, az *Arabidopsis* AtDMC1 promotere és a pTA7001 indukálható promoter. A DcEP3-1 gén tranziensen expresszálódik a belső magburok lebomlása során, később pedig azokban a sejtekben, amik a fejlődő endosperma belső részét borítják. Az AtChitIV gén tranziensen expresszálódik a mikropiláris endospermában, egészen a cellularizációig. Az LTP-1 promoter aktív a fejlődő magdudorbél epidermiszében, mindkét magburokban, a mag külsejében és a korai embrióban expresszálódik. A bel-1 gén a fejlődő belső magburokban expresszálódik, és az fbp-7 promoter az embriózacskó fejlődése során aktív. Az *Arabidopsis* ANT gén a magburok fejlődése során expresszálódik, az O216 gén pedig a *Phalaenopsis*-ban expresszálódik az érett magrügyben.



A DcEP3-1 és az AtChit IV gének promoterei standard eljárásokkal klónoozhatók és jellemezhetők. A SERK jel-kaszád fehérjéjét kódoló gént a DcEP3-1, az AtChit IV vagy az AtLTP-1 promoter mögé klónozzuk, majd *Arabidopsis*-ba transzformáljuk. A ligálást úgy hajtjuk végre, hogy a promotert működés szempontjából az átírandó szekvencia mögé kötjük. Ezt a konstrukciót, ami tartalmaz még ismert marker géneket is, amik a transzformált anyag szelekciójához kellenek, egy bináris vektor, azaz például pBIN19 T-DNS régiójába építjük be, majd *Arabidopsis*-ba transzformáljuk. Az *Arabidopsis*-ba történő, *Agrobacterium*-által közvetített transzformációt a szakterületen jártas szakember számára jól ismert vákuum infiltrációval vagy gyökértranszformációval hajtjuk végre. A transzformált sejteket szelektáljuk és összegyűjtjük, majd (ahol lehetséges) normális önbeporzással rögzítjük. A 35S konstrukciókkal és a teljes SERK génnel végzett párhuzamos transzformációkat használjuk kontrollként, hogy a túlexpressziót kiértékeljük több sejtben, vagy csak abban a néhány sejtben, amik természetes körülmények között is expresszálják a gént. A 35S promoter konstrukció eredményezheti embrió képződését, amikor a jel, ami aktiválja a SERK által befolyásolt transzdukciót, jelen van a növényben. Létrehoztunk egy vizsgáló rendszert, ami a kasztrálás és olyan donor-növény sejtvonalak létrehozásán alapul, amik az LTP1 promoter-GUS és SERK promoter-barnáz konstrukciót hordozó pollent termelnek.

Ugyanazok a konstrukciók (35S, AtChitV, AtLTP-1 és SERK promoterek a SERK-vel kölcsönhatásba lépő kódoló szekvenciák-



hoz kapcsolva) használhatók számos különböző *Arabidopsis* háttérbe, azaz például vad-típusú, himsteril, fis (az emb 173 allélje) és primordia timing (pt)-1 vonalakba való transzformálásra, vagy ezek közül a hátterek közül kettőnek vagy többnek a kombinációjába való transzformálásra. A vad-típusú vonalakat kontrollként használjuk, hogy kiértékeljük a normális zigótás embriogenezisre gyakorolt lehetséges hatást, és hogy kiértékeljük a magot megtermékenyítő közeg nélkül, a kasztrálás után. Az ms vonalakat arra használjuk, hogy közvetlenül kiértékeljük a magokat megtermékenyítő közeg nélkül. A fis vonalak mutatnak bizonyos mértékű mag- és embrió-fejlődést megtermékenyítő közeg nélkül, így várható, hogy van természetes hajlamuk az apomiktikus embriogenezisre, amit a konstrukciók jelenléte fokozhat. A pt-1 vonal kiváló regenerálódási képességgel rendelkezik, és arra használták, hogy az első stabilan embriogén *Arabidopsis* sejtszuszpenziós tenyészeteket iniciálják vele. Az előzőekben említett hátterek közül többnek a kombinációját úgy kapjuk meg, hogy keresztezzük őket egymással, valamint olyan vonalakkal, amik ektopikusan expresszálnak a SERK-kel kölcsönhatásba lépő fehérjéket. Az MS vonalak kivételével a szaporítást elvégezhetjük normális önbeporzással, és az apomiktikus tulajdonságok elemzésével. Hasonló stratégiát követünk, ha az ATChiIV, AtLTP-1 és SERK promotereket a bel-1 és fbp-7 promoterekkel, valamint más, a nőivarú gaméta komponenseire specifikus promoterekkel helyettesítjük.



A jelen találmány tárgyát képezik továbbá az olyan vektorok, amik az előző bekezdésekben említett DNS-t tartalmazzák, a vektorral transzformált növények, az ilyen növények utódai, amik a DNS-t stabilan beépülve tartalmazzák, valamint az ilyen növények vagy ilyen utódok apomiktikus magvai.

Az expresszálandó géneket számos, a szakterületen ismert módszerrel lehet bejuttatni a növénysejtekbe, amiket a WO 97/43427 számú szabadalmi leírás 7. és 8. oldalán ismertetnek.

A jelen találmány oltalmi körébe tartoznak továbbá a transzgenikus növények, főleg a termékeny transzgenikus növények, amiket az előzőekben ismertetett eljárásokkal transzformáltunk, valamint ezek aszexuális és/vagy szexuális utódai, amik még stabilan tartalmazzák a beépített DNS-t, és/vagy az ilyen növények vagy növényi utódok apomiktikus magvai. Az ilyen növényeket ugyanúgy lehet használni, mint ahogy azt a WO 97/ a 423427 számú szabadalmi leírásban ismertetik.

A jelen találmány szerinti transzgenikus növény lehet két-szikú vagy egyszikú növény. Ilyen növények lehetnek a szántóföldi növények, a zöldségek és a gyümölcsök, beleértve a paradicsomot, a borsot, a sárgadinnyét, a salátát, a karfiolt, a brokkolit, a káposztát, a kelbimbót, a cukorrépat, kukoricát, az édeskukoricát, a hagymát, a répát, a póréhagymát, az uborkát, a dohányt, a lucernát, a padlizsánt, a céklát, a disznóbabot, a zellert, a cikóriát, a tehénborsót, az endiviát, a lopótököt, a földimogyorót, a papayát, a borsót, a mogyorót, az ananászt, a burgonyát, a pórsáfrányt, a zöldbabot, a szójababot, a spenótot, sütőtököt, a



napraforgót, a cirkot, a görögdinnyét, és hasonlókat; valamint a dísznövényeket, mint például Impatiens, Begonia, Petunia, Pelargonium, Viola, Cyclamen, Verbena, Vinca, Tagetes, Primula, Saint Paulia, Ageratum, Amaranthus, Anthirrhinum, Aquilegia, Chrysanthemum, Cineraria, Clover, Cosmo, Cowpea, Dahlia, Datura, Delphinium, Gerbera, Gladiolus, Gloxinia, Hippeastrum, Mesembryanthemum, Salpiglossis, Zinnia, és hasonlók. Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint a DNS-t „termény magvakban” expresszáltatjuk, azaz például kukoricában, édeskukoricában, borsóban, stb., oly módon, hogy az apomiktikus magok, amik az ilyen expresszióból származnak, fizikailag nincsenek elmutáltatva, vagy más módon károsítva, a nem-transzformált hasonló terményekből nyert magvakkal összehasonlítva. A *Graminaceae* családba tartozó egyszikű növényeket részesítjük előnyben, beleértve a *Lolium*, *Zea*, *Triticum*, *Triticale*, *Sorghum*, *Saccharum*, *Bromus*, *Oryzae*, *Avena*, *Hordeum*, *Secale* and *Setaria* növényeket.

Még inkább előnyben részesítjük a transzgenikus kukoricát, búzát, árpát cirkot, rozsot, zabokat, pázsitfűféléket és takarmányfüveket, kölest, rizst és cukorrépát. Különösen előnyben részesítjük a kukoricát, a búzát, a cirkot a rozsot, a pázsitfűféléket és a rizst.

A kétszikű növények közül a továbbiakban az *Arabidopsis*, szójabab, gyapot, cukorrépa, olajrepce, dohány és napraforgó növényeket részesítjük inkább előnyben. Különösen előnyben részesítjük a paradicsomot, a borsot, a sárgadinnyét, a salátát, a



Brassica zöldségeket, a szójababot, a gyapotot, a dohányt, a cukorrépat és az olajrepcét.

Az „utód” szakkifejezés a transzgenikus növényeknek mind az „aszexuálisan”, mind a „szexuálisan” létrejött utódaira vonatkozik. Ez a definíció szerintünk az ismert eljárásokkal, azaz például a sejtfúzióval vagy mutáns szelekcióval kapott összes mutánsra és variánsra is vonatkozik, amik még rendelkeznek a kiindulási transzformált növény jellemző tulajdonságaival, a transzformált növényi anyag összes keresztezési és fúziós termékével együtt. Ide tartoznak a visszakeresztezésből származó utódnövények is, mindaddig, amíg az említett utódnövények még tartalmazzák a jelen találmány szerinti DNS-t.

A jelen találmány tárgyát képezik továbbá a transzgenikus növények szaporító anyagai is. A jelen találmány szerint ezt úgy definiáljuk, mint bármilyen növényi anyag, ami szexuálisan vagy aszexuálisan szaporítható *in vivo* vagy *in vitro*. A jelen találmány szerint különösen előnyösek a protoplasztok, sejtek, kalluszok, szövetek, szervek, magvak, embriók, pollen, csírasejtek, zigóták, minden más, transzgenikus növényekből nyerhető szaporító anyaggal együtt.

A növények részei, azaz például a jelen találmány szerinti módszerekkel korábban transzformált transzgenikus növényekből vagy utódaikból származó, és ennek következtében legalább részben transzgenikus sejteket tartalmazó virágok, szárazak, gyümölcsök, levelek, gyökerek is a jelen találmány oltalmi



körébe tartoznak. Különösen előnyben részesítjük az apomiktikus magvakat.

A jelen találmány illusztrálására egy SERK-kel kölcsönhatásba lépő gén *Arabidopsis*-ban való transzgenikus expresszióját adhatjuk meg, amely expresszió növényi expressziós szignálok, főleg egy olyan promoter vezérlésével játszódik le, ami a SERK gének expresszióját szabályozza növényekben, de előnyösen egy, a fejlődési folyamat által szabályozott vagy indukálható promoterral, azaz például az *Arabidopsis* ANT gén promoterével, a *Phalaenopsis* O216 gén promoterével, a répa kitináz DcEP3-1 gén promoterével, az *Arabidopsis* AtChitIV gén promoterével, az *Arabidopsis* LTP-1 gén promoterével, az *Arabidopsis* bel-1 gén promoterével, a petúnia fbp-7 gén promoterével, az *Arabidopsis* AtDMC1 promoterével és a pTA7001 indukálható promoterével.

A DcEP3-1 és az AtChit IV gének promotereit standard eljárásokkal klónozzuk és jellemezhetjük. A kívánt kódoló szekvenciát a DcEP3-1, AtChit IV vagy az AtLTP-1 promoter mögé klónozzuk, majd *Arabidopsis*-ba transzformáljuk. A ligálást úgy hajtjuk végre, hogy a promotert működés szempontjából az átírandó szekvencia mögé kötjük. Ezt a konstrukciót, ami tartalmaz még ismert marker géneket is, amik a transzformált anyag szelekciójához kellenek, egy bináris vektor, azaz például pBIN19 T-DNS régiójába építjük be, majd *Arabidopsis*-ba transzformáljuk. Az *Arabidopsis*-ba történő, *Agrobacterium*-által közvetített transzformációt a szakterületen jártas szakember számára jól ismert vákuum infiltrációval vagy gyökértranszformációval hajtjuk vég-



re. A transzformált sejteket szelektáljuk és összegyűjtjük, majd (ahol lehetséges) normális önbeporzással rögzítjük. A 35S konstrukciókkal és a teljes SERK génnel végzett párhuzamos transzformációkat használjuk kontrollként, hogy a túlexpressziót kiértékeljük több sejtben, vagy csak abban a néhány sejtben, amik természetes körülmények között expresszálják a gént. A 35S promoter konstrukció eredményezheti embrió képződését, amikor a jel, ami aktiválja a SERK által befolyásolt transzdukciót, jelen van a növényben. Létrehoztunk egy vizsgáló rendszert, ami a kasztráláson és olyan donor-növény sejtvonalak létrehozásán alapul, amik az LTP1 promoter-GUS és SERK promoter-barnáz konstrukciót hordozó pollent termelnek.

Ugyanazok a konstrukciók (35S, AtChitV, AtLTP-1 és SERK promoterek a SERK-kel kölcsönhatásba lépő kódoló szekvenciákhoz kapcsolva) használhatók számos különböző *Arabidopsis* háttérbe, azaz például vad-típusú, hímsteril, fis (az emb 173 allélje) és primordia timing (pt)-1 vonalakba való transzformálásra, vagy ezek közül a hátterek közül kettőnek vagy többnek a kombinációjába való transzformálásra. A vad-típusú vonalakat kontrollként használjuk, hogy kiértékeljük a normális zigótás embriogenezisre gyakorolt lehetséges hatást, és hogy kiértékeljük a magot megtermékenyítő közeg nélkül, a kasztrálás után. Az ms vonalakat arra használjuk, hogy közvetlenül kiértékeljük a magokat megtermékenyítő közeg nélkül. A fis vonalak mutatnak bizonyos mértékű mag- és embrió-fejlődést megtermékenyítő közeg nélkül, így várható, hogy van természetes hajlamuk az apomiktikus embrioge-



nezisre, amit a konstrukciók jelenléte fokozhat. A pt-1 vonal kiváló regenerálódási képességgel rendelkezik, és arra használták, hogy az első stabilan embriogén *Arabidopsis* sejtszuszpenziós tenyészeteket iniciálják vele. Az előzőkben említett hátterek közül többnek a kombinációját úgy kapjuk meg, hogy keresztezzük őket egymással, valamint olyan vonalakkal, amik ektopikusan expresszálják a SERK-kel kölcsönhatásba lépő fehérjéket. Az MS vonalak kivételével a szaporítást elvégezhetjük normális önbeporzással, és az apomiktikus tulajdonságok elemzésével. Hasonló stratégiát követünk, ha az ATChiIV, AtLTP-1 és SERK promotereket a bel-1 és fbp-7 promoterekkel, valamint más, a nőivarú gaméta komponenseire specifikus promoterekkel helyettesítjük.

Bár a jelen találmányt a termőlevél magdudorbél régiójában levő, a SERK-kel kölcsönhatásba lépő gén heterológ expressziójával keletkező apomiktikus magvak termelése alapján írtuk le, a szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy más gének expressziója, amiknek a termékei hasonló struktúrával/funkcióval rendelkeznek, hasonló eredményeket ad. Emellett, bár a példa az apomiktikus magtermelést illusztrálja *Arabidopsis*-ban, a találmány természetesen nem korlátozódik az apomiktikus gént indukáló génekre kizárólag ebben a növényben. Emellett a találmányban ismertetjük annak lehetőségét, hogy a találmány szerinti génszekvenciákat a transzformált növényi anyagban konstitutív, nem-szövet-specifikus módon expresszáljuk, például egy CaMV35S vagy NOS promoter transzkripciós vezérlése alatt.



A jelen találmányból hasznot húzó, a szakterületen jártas szakember számára az is nyilvánvaló, hogy egy SERK-kel kölcsönhatásba lépő gének transzformálhatók a növényi anyagba, ami azután szaporítható és/vagy differenciálódhat, majd explantumként használható, amiből szomatikus embriókat lehet előállítani. Az ilyen szekvenciáknak a transzformált szövetben való expressziója lényegesen megnöveli azoknak a sejteknek a százalékát a szövetben, amik kompetensek a szomatikus embriók létrehozásában, a nem-transzformált hasonló szövetekben levő sejtek számával összehasonlítva.

Az alábbi példákban illusztráljuk a SERK-kel kölcsönhatásba lépő fehérjéket kódoló gének izolálását és klónozását, valamint az apomiktikus magvak előállítását az említett gének heterológ expressziójával a termőlevél magdudorbél régiójában, oly módon, hogy szomatikus embriók keletkeznek, amik behatolnak az embriózacszkóba és a mag kapszulázza a fejlődése során.

## Példák

### 1. Példa

Az *Arabidopsis* SERK géntermékkel kölcsönhatásba lépő fehérjéket kódoló *Arabidopsis* gének izolálása

### A SERK csali-plazmid konstrukciója

Az AtSERKtot61 *Arabidopsis* SERK klón pBluescript SK--ban levő cDNS szekvenciáját használjuk DNS templátként, hogy polimeráz láncreakcióval amplifikáljuk a SERK nyitott leolvasási



keretét, az N-terminális nélkül, az alábbi oligonukleotid primereket használva:

V6 (5'ATGCTTTGCATAACTTTGAGG-3'); 17. számú szekvencia és T7 (5'-AATACGACTCACTATAG-3'); 18. számú szekvencia.

A kapott polimeráz láncreakció terméket a pGEM-T vektorba (Promega) klónozzuk. A kapott plazmidból egy NcoI-NotI fragmentst izolálunk, majd az élesztő pEG202 SERK lexA két hibrid csali vektor (Origene) NcoI-NotI hasítási helyére klónozzuk. Nukleotid szekvencia elemzést végzünk, hogy igazoljuk a polimeráz láncreakció termék helyes orientációját és szekvenciáját a keletkezett SERK csali plazmidban. A csali-fehérje expresszióját és aktivitását a szakirodalomban ismertetett leírásnak megfelelően határozzuk meg [E.A. Golemis; J. Gyuris és R. Brent: Current Protocols in Molecular Biology, 20. fejezet, 33. kiegészítés (1996)]. A konstrukcióról kimutattuk, hogy transzkripció aktivitással rendelkezik az élesztő EGY48 törzsben. Emellett a represszor aktivitása a riporter génen a SERK gén helyes nukleáris lokalizációját mutatja. Az élesztő csali-plazmiddal transzformált élesztő leucin heterotrófnak bizonyult, jelezve, hogy a konstrukció nem a lexA szelekciós szűrővizsgálat autoaktiválásának eredménye. A vizsgálatok azt demonstrálják, hogy SERK csali-konstrukció alkalmas a lexA kettő hibrid szűrővizsgálatra.

#### A lexA kettő hibrid könyvtár szűrővizsgálata

Az EGY48 élesztőtörzset a pSH18-34 LacZ riporter plazmiddal (Origene) transzformáljuk, majd a pEG202 SERK csali-



vektort a pJG4-5 cDNS könyvtár vektorral transzformáljuk, a szakirodalomban ismertetett LiAc/PEG4000 eljárással [E.A. Golemis; J. Gyuris és R. Brent: Current Protocols in Molecular Biology, 20. fejezet, 33. kiegészítés (1996)]. Az *Arabidopsis thaliana* fiatal becő szövetéből - ami globuláris állapotú embriókat tartalmaz - származó cDNS-könyvtárat kaptunk (Prof. Gerd Jürgens, Tübingen ajándéka). A primer könyvtár körülbelül 2000000 cDNS klónt tartalmaz, az átlagos inszert-méret 1,4 kilobázis (90 klón alapján számítva, amikben az inszert nagysága 0,2-4,5 kilobázis között változik). A klónok 10%-a nem tartalmaz inszertet. A könyvtárat *Escherichia coli*-ban egyszer amplifikáljuk, mielőtt átvizsgálnánk a SERK-fehérje kölcsönhatásra nézve. A fúziós fehérjék pJG4-5-ben való indukcióját galaktóznak a táptalajba tételével végezzük. Nem-indukáló körülmények között az élesztősejteket glükózon szaporítjuk, és ekkor nem expresszálják a pJG4-5 fúziós fehérjét. 4200000 zsákmány cDNS klónt transzformálunk a pEG202 SERK csali-plazmidot és a pSH18-34 riporter plazmidot tartalmazó élesztőtörzsbe. A transzformáció hatékonysága 270000 telep per mikrogramm vektor DNS. A pJG4-5 plazmid tartalmazza a TRP2 szelekciós markert, a pSH18-34 plazmidnak van egy URA3 szelekciós markere és a pEG202 tartalmaz egy HIS3 szelekciós markert. A transzformált élesztősejteket komplett minimál (CM) táptalajban szaporítjuk, amely táptalajt vagy 2% glükózzal, vagy 2% galaktóz + raffinóz eleggyel egészítünk ki (az utóbbi esetben a pJG4-5 vektoron levő, galaktózzal indukálható promoter aktiválódik, ami a cDNS

könyvtár fúziós fehérjéinek expresszióját eredményezi). Az EGY48 élesztőtörzs hat LexA operátort tartalmaz, amik a LEU2 génről való transzkripciót vezérlik. Amikor mind a SERK fúziós fehérje, mind a cDNS könyvtár fúziós fehérje expresszálódik, a SERK fúziós fehérje LexA DNS-kötő doménje kölcsönhatásba léphet a könyvtár cDNS fúziós fehérje aktivációs doménjével, ezáltal egy aktív lexA transzkripciós faktort képezve, ami viszont lehetővé teszi a leucin autotróf transzformánsok szelekcióját a pSH18-34-en levő LacZ riporter konstrukció egy LexA operátort tartalmaz a LEU2 génétől eltérő promoter kontextusban. Az Xgal és egy aktív LexA transzkripciós komplex is lehetővé teszi LacZ aktivitás meghatározását.

Mindhárom plazmid tripla szelekcióját GLU/CM-his-ura-trp 24 cm/24 cm lemezeken hajtjuk végre, lemezenként körülbelül 100000 teleppel. Összesen 4200000 élesztő primer transzformánst kapunk. A telepeket steril üveg fedőlemezzel levakarjuk, két különböző, A illetve B jelölésű, 50 ml-es csőben gyűjtjük össze, majd -80 °C-ra lefagyasztjuk. Ahhoz, hogy megbecsüljük a telep titeret, a mintát GAL/RAF/CM-ura-his-trp-leu lemezekre szélesztjük. A titer meghatározása után folytatjuk a könyvtár átvizsgálását, egy-egy 10cm/10cm-es lemezre körülbelül 1000000 telepet szélesztve. Összesen 36000000 telepet szélesztünk GAL/CM-his-ura-trp-leu leu szelekciós lemezekre (20 millió az A csőből, 16 millió a B csőből). A telepeket akkor izoláljuk, ha a teleek átmérője legalább 1 mm. Az izolált telepek száma az egyes napokon és az egyes csővekből az alábbi táblázatban látható:



<b>2 nap</b>	<b>3 nap</b>	<b>4 nap</b>
15A	93A	27A
9B	81B	25B

Minden izolált telepet egy másik lemezre szélesztünk át, hogy meghatározzuk a LacZ aktivitást, és csak azokat a telepeket választjuk ki, amik megfelelnek az egyes közegekre ismertett kritériumoknak. Az alábbiakban az egyes napokon és az egyes csövekből izolált telepek számát mutatjuk be:

GAL/RAF/CM	-ura-his-trp-leu	van növekedés
GLU/CM	-ura-his-trp-leu	nincs növekedés
GAL/RAF/CM	-ura-his-trp+Xgal	kék, és van növekedés
GLU/CM	-ura-his-trp+Xgal	nem kék, és van növekedés

<12 óra	20 óra	28 óra	48 óra	72 óra
4A	17A	9A	11A	24A
2B	6B	5B	15B	24B

Összesen körülbelül 250 telep nőtt leucin szelekciós lemezeken, és vizsgáltuk meg a lacZ aktivitását. Ezek közül a telepek közül 107 festődött kéken, ami a lacZ aktivitás indikátora.

Ezzel a 107 teleppel végzett telep-polimeráz láncreakció a pJG4-5 zsákmány vektor klónozó helye körül levő primerekkel, a polimeráz láncreakció termékének mérete alapján körülbelül 10 különböző cDNS-klón csoportot eredményezett. A polimeráz láncreakció



reakciós fragmensek Sau3A1 restriktív enzimmel való emésztése a SERK-kölcsönhatásra kandidáló cDNS klónok különböző osztályainak sokkal részletesebb csoportosítását teszi lehetővé. Mindegyik különböző osztály tagjait használjuk arra, hogy a zsákmány plazmidot izoláljuk és *Escherichia coli*-ba klónozzuk, valamint arra, hogy meghatározzuk a nukleotid- és a kikövetkeztetett aminosav szekvenciát. A zsákmány-plazmidokat visszatranszformáljuk élesztőbe, majd vizsgáljuk a leu szelekció és a lacZ aktivitás SERK-dependens aktiválását. A retranszformációs kísérletek után mindegyik DNS klón osztály képes SERK-dependens élesztő LexA kettő hibrid kölcsönhatást mutatni. Mindegyik ilyen klón intracelluláris vagy membránhoz kötődő faktorokat reprezentál, amik szerepet játszanak a SERK receptor kináz fehérje által közvetített jelátviteli bioszintézis útban. Összesen 8 különböző SERK-kel kölcsönhatásba lépő fehérjét azonosítottunk.

## 2. Példa

### A SERK-kel kölcsönhatásba lépő fehérjék működése

A fehérjék négy, a SERK-kel kölcsönhatást mutató csoportja a Squamosa-promoter Binding Protein (SBP) transzkripció faktorok családjába tartozik [Klein és mtsai: *Molecular and General Genetics* 250, 7-16 (1996)]. Ezeket a 3A35 (1. számú szekvencia és 2. számú szekvencia), a 3B39 (3. számú szekvencia és 4. számú szekvencia), a 4B19 (5. számú szekvencia és 6. számú szekvencia) és a 3A52 (7. számú szekvencia és 8. számú



szekvencia) klónok reprezentálják. Ezek a fehérjék képesek kölcsönhatásba lépni a DNS-sel, egy 79 aminosavból álló, konzerválódott doménon, az SBP-boxon keresztül. Az SBP-boxban a a cisztein és hisztidin csoportok figyelemre méltó elrendezése látható, ami emlékeztet a cink-ujjakra, és valószínűleg szerepet játszik a specifikus promoter-elemek felismerésében. Egy kétrészes nukleáris lokalizációs szignál található az SBP-box C-terminálisán [Dingwall és mtsai: Trends in Biochem. Sci. 16, 478-481 (1991)]. A SERK-vel kölcsönhatásba lépő SBP fehérjének mind az N-terminális, mind a C-terminális doménjei nagyon variábilisak, és valószínűleg szerepet játszanak a fehérje aktivitásának szabályozásában. Az egyik lehetséges SBP fehérje azonos az SPL3-mal, amit a 4B19 reprezentál, ami a virág tranzícióban szerepet játszó gén, és a fejlődő virágrügyekben expresszálódik [Cardon és mtsai: Plant Journal 12, 367-377 (1997)]. A SERK és az SBP fehérjék által befolyásolt jelátviteli bioszintézis út legvalószínűbb modellje a citoplazmatikus SBP-transzkripciós faktorok transzfoszforilezése a SERK-vel a ligandum megkötése után, majd ezt követi a faktorok nukleáris transzlokációja és a genomon levő specifikus szabályozó DNS célpontokhoz való kötődés. A jelátvitelnek egy hasonló módját írták le az állati szerintreonin receptor-kináz fehérjékre, amikről ismert, hogy transzfoszforileznek egy úgynevezett SMAD transzkripciós faktor családot. A foszforilezett, aktivált SMAD fehérjék áthelyeződnek a sejtmagba [Heldin és mtsai: Nature 390, 465-471 (1997)].



A SERK-vel kölcsönhatásba lépő fehérjék egy másik osztályát a 14-3-3 fehérjék családjának egy izoformája reprezentálja. A 4B11 (9. számú szekvencia és 10. számú szekvencia) azonos a 14-3-3 típusú lambda fehérjével [Wu és mtsai: *Plant Physiology* 114, 1421-1431 (1997)]. Összesen 10 különböző 14-3-3 fehérje van jelen az *Arabidopsis*-ban, és a különböző tagok az intracelluláris jelátvitelben játszanak szerepet. Befolyásolják a jelátvitelt, oly módon, hogy a specifikus kötő motívumokon (amiket például az olyan konzerválódott aminosav szekvenciák reprezentálnak, mint az RxxS(p)xP) a foszfoszerint tartalmazó fehérjékhez kötődnek [Yaffe és mtsai: *Cell* 91, 961-971 (1997)]. Egy feltételezett 14-3-3 kölcsönhatás domént, aminek a szekvenciája RPPSQP, megtalálták az *Arabidopsis* SERK fehérje 391-396-os pozíciójában, valamint a *Daucus carota* SERK fehérje ennek megfelelő illesztett régiójában, aminek aminosav szekvenciája RQPSEP, ami a SERK-et egy mechanizmussal látja el egy 14-3-3 közvetített jelátvitelhez.

A 4A24 (11. számú szekvencia és 12. számú szekvencia) egy kicsi, új *Arabidopsis* géncsalád egyik tagját reprezentálja, aminek az egyik tagját a szakirodalomban ismertették NDR1 fehérjeként [Century és mtsai: *Science* 278, 1963-1965 (1997)]. Az NDR1 valószínűleg egy membránhoz kapcsolódó komponenst kódol a jelátviteli bioszintézis útban, a patogént felismerő fehérjék után. Azt javasolták, hogy az NDR1 egy olyan fehérje lehet, ami számos különböző receptorral lép kölcsönhatásba. A 4A24 egy új tagot reprezentál ebben a kis fehérjecsaládban, amiről feltétele-



zik, hogy a transzmembrán receptorok által befolyásolt intraceluláris jelátvitelben játszik fontos szerepet.

A 3B76 klón (13. számú szekvencia és 14. számú szekvencia) egy, az *Escherichia coli* aminopeptidáz N-nel homológ fehérjét kódol, és feltételezik, hogy egy *Arabidopsis* proteázt kódol, ami kölcsönhatásba lép a SERK-kel, vagy aktiválja a SERK.

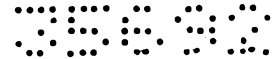
A 4A5 klón által reprezentált, kikövetkeztetett aminosav szekvencia (15. számú szekvencia és 16. számú szekvencia) nem mutat homológiát ismert géntermékekkel, bár létezik a rokon géntermékeknek egy kicsi, még le nem írt családja *Arabidopsis*-ban (AA585806, AA651106, T45539).

### 3. Példa

#### Az *Arabidopsis* transzformálása SERK-kel kölcsönhatásba lépő fehérjéket kódoló génekkel

##### Promoter szekvenciákat tartalmazó plazmidok

- A CamV 35S promotert, amit a -343-tól a -93-ig terjedő régió duplikálásával lehet erősíteni [Kay és mtsai: Science 236, 1299-1302 (1987)], a mMON999 vektorból izoláljuk, HindIII és SstI restriktív enzimekkel való emésztéssel, majd a pBluescript SK- vektorba klónozzuk, így kapjuk a pMT120 vektort.
- A *Petunia*-ból származó FBP7 gén promoterét [Angenent és mtsai: Plant Cell 7, 1569-1582 (1995)] az FBP7 0,6 kilobázis méretű HindIII-XbaI genomiális DNS fragmensének a



pBluescript KS- HindIII-XbaI hasítási helyére való szubklónozásával klónozzuk, így kapjuk az FBP201 vektort.

### Teljes hosszúságú, SERK-kel kölcsönhatásba lépő cDNS klónokat tartalmazó plazmidok

Az azonosított, SERK-kel kölcsönhatásba lépő géntermékek teljes hosszúságú cDNS-ét a korai állapotú *Arabidopsis* becőtermés RNS reverz transzkriptáz polimeráz láncreakciójával (RT-PCR) állítjuk elő. A teljes hosszúságú cDNS-t a 3A35, 3A52 és 4B19 klónokból izoláljuk. A 3B39 klón már teljes hosszúságú cDNS klónként van jelen. Az oligonukleotid szekvenciák az azonos BAC vagy EST klónok nukleotid szekvenciáin alapulnak.

### Bináris vektor konstrukciók

A pBIN19 vektor alapján egy bináris vektort készítünk az *Arabidopsis thaliana* SERK-kel kölcsönhatásba lépő cDNS (különböző promoterek vezérlete alatt) transzformálására. A SERK-kel kölcsönhatásba lépő, feltételezett SBP-transzkripció faktorok teljes hosszúságú cDNS klónjait Klenow kezeléssel tompavégűvé tesszük, majd a pBIN19 SmaI hasítási helyére klónozzuk. Az *rbcS::E9* génből származó poliadenilezési szekvenciát [Millar és mtsai: *Plant Cell* 4, 1075-1087 (1992)] a kódoló szekvencia után helyezük el, oly módon, hogy egy Klenow fragmenssel feltöltött EcoRI-HindIII E9 DNS fragmenst a pBIN19::SERK kölcsönhatási faktor egy Klenow fragmenssel feltöltött XmaI hasítási helyére klónozzuk, hogy a pAt3A35, pAt3A52, pAt4B19 és pAt3B39 biná-



ris vektorokat létrehozunk. A pAt bináris vektorokat használjuk promoter-SERK kölcsönhatási faktor konstrukciók készítésére.

- A CaMV 35S promotert a pAt vektor konstrukciók SmaI hasítási helyére klónozzuk, egy Klenow fragmenssel feltöltött KpnI-SstI fragmens formájában, így kapjuk a p35Sat vektorokat.
- Az FBP201 SacI-KpnI fragmensét Klenow fragmenssel töltjük fel, majd a pAt vektor konstrukciók SmaI hasítási helyére klónozzuk, így kapjuk a pFBP201At vektorokat.

#### A növényi expressziós vektorok bevitele *Arabidopsis thaliana* növényekbe

Az előzőekben említett vektor-konstrukciókat elektro-transzformáljuk *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 törzsbe. A vad-típusú *Arabidopsis thaliana* WS növényeket standard, hosszú nappalnak megfelelő körülmények között neveljük (16 órás megvilágítás, 8 óra sötétség). Az elsőként megjelenő fluoreszcencia-t eltávolítjuk, hogy növeljük az fluoreszcencia számát. Öt nappal később a növényeket vákuum-infiltrációs eljárásban alkalmazzuk. A transzformált *Agrobacterium* C58C1 növényt 50 mg/l kanamicint, 50 mg/l rifampicint és 25 mg/l gentamicint tartalmazó LB lemezekben szaporítjuk. Izolált telepeket használunk 500 ml (az előzőek szerinti) folyékony táptalaj beoltására, majd éjszaka át 28 °C-on tartjuk. A log fázisú tenyészetet ( $OD_{600}=0,8$ ) centrifugáljuk, hogy a sejteket kiülepítsük, majd 150 ml infiltrációs táptalajban (0,5x MS táptalaj, pH=5,7, 5% szacharóz és 1



mg/l benzilaminopurin) reszuszpendáljuk. A 6 *Arabidopsis* növény fluoreszcenciáit az infiltrációs szuszpenzióba merítjük, míg a növények többi részét (amik még cserépben vannak) fejjel lefelé dróthálóra tesszük, hogy elkerüljük az infiltrációs közeggel való érintkezésüket. A teljes rendszerre 10 percre 50 kPa vákuumot bocsátunk. A növényeket ezután közvetlenül standard hosszú nappalos körülmények közé helyezzük. A maghozás befejeződése után a magvakat a felszínükön sterilezzük 1% nátrium-hipokloritba való merítéssel, majd alaposan mossuk steril vízzel, és Petri-csészékre ültetjük, amik 0,5X MS táptalajt, 1% agarral és 80 mg/l kanamicinnel kiegészítve tartalmazznak, hogy szelektáljuk a transzformált magvakat. Hosszú nappalos körülmények (10000 lux) között 7 napig végzett csíráztatás után transzformált hajtásokat azonosíthatjuk a sziklevelük zöld színe, és az első igazi levelek megjelenése alapján. A transzformált hajtásokat tovább neveljük talajban, hosszú nappalos körülmények között. A vákuum-infiltrációs módszer körülbelül 0,1% transzformált magvat eredményez.

Az alábbiakban részletesen ismertetjük a leírásban említett szekvenciákat.





1. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
  - (A) Hossz: 551 bázispár
  - (B) Típus: nukleinsav
  - (C) Száltípus: kétszálú
  - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS-ről mRNS
- (iii) Elméleti: Nem
- (iii) Antiszensz: nem
- (vi) Eredeti forrás:
  - (A) *Arabidopsis thaliana*
- (vii) Közvetlen forrás:
  - (B) Klón: 3A35
- (xi) A szekvencia leírása: 1. számú szekvencia

```
ACGTGTCCGT GGAGGCGGGT CGGTTCAGTC GGGTCAGATA CCAAGGTGCC AAGTGAAGG      60
TTGTGGGATG GATCTAACCA ATGCAAAAGG TTATTACTCG AGACACCGAG TTTGTGGAGT      120
GCACTCTAAA ACACCTAAAG TCACTGTGGC TGGTATCGAA CAGAGGTTTT GTCAACAGTG      180
CAGCAGGTTT CATCAGCTTC CGGAATTTGA CCTAGAGAAA AGGAGTTGCC GCAGGAGACT      240
CGCTGGTCAT AATGAGCGAC GAAGGAAGCC ACAGCCTGCG TCTCTCTCTG TGTTAGCTTC      300
TCGTTACGGG AGGATCGCAC CTTCGCTTTA CGAAAATGGT GATGCTGGAA TGAATGGAAG      360
CTTCTCTGGG AACCAAGAGA TAGGATGGCC AAGTTCAAGA ACATTGGATA CAAGAGTGAT      420
GAGGCGGCCA GTGTCATCAC CGTCATGGCA GATCAATCCA ATGAATGTAT TTAGTCAAGG      480
TTCAGTTGGT GGAGGAAGGA CAAGCTTCTC ATCTCCAGAG ATTATGGACA CTAAACTAGA      540
GAGCTACAAG G      551
```



2. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
  - (A) Hossz: 375 aminosav
  - (B) Típus: aminosav
  - (C) Száltípus: egyszálú
  - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: fehérje
- (iii) Elméleti: Nem
- (iii) Antiszensz: nem
- (vi) Eredeti forrás:
  - (A) *Arabidopsis thaliana*
- (vii) Közvetlen forrás:
  - (B) Klón: 3A35
- (xi) A szekvencia leírása: 2. számú szekvencia

Met	Glu	Met	Gly	Ser	Asn	Ser	Gly	Pro	Gly	His	Gly	Pro	Gly	Gln	Ala	
1			5				10							15		
Glu	Ser	Gly	Gly	Ser	Ser	Thr	Glu	Ser	Ser	Ser	Phe	Ser	Gly	Gly	Leu	
		20					25						30			
Met	Phe	Gly	Gln	Lys	Ile	Tyr	Phe	Glu	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
		35					40						45			
Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Gly	Arg	Ser	Asn	Arg	Arg	Val	Arg	Gly	Gly	Gly	
		50				55					60					
Ser	Gly	Gln	Ser	Gly	Gln	Ile	Pro	Arg	Cys	Gln	Val	Glu	Gly	Cys	Gly	
65					70					75					80	
Met	Asp	Leu	Thr	Asn	Ala	Lys	Gly	Tyr	Tyr	Ser	Arg	His	Arg	Val	Cys	
				85					90					95		
Gly	Val	His	Ser	Lys	Thr	Pro	Lys	Val	Thr	Val	Ala	Gly	Ile	Glu	Gln	
				100				105						110		
Arg	Phe	Cys	Gln	Gln	Cys	Ser	Arg	Phe	His	Gln	Leu	Pro	Glu	Phe	Asp	
		115					120						125			
Leu	Glu	Lys	Arg	Ser	Cys	Arg	Arg	Arg	Leu	Ala	Gly	His	Asn	Glu	Arg	
	130					135						140				
Arg	Arg	Lys	Pro	Gln	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Val	Leu	Ala	Ser	Arg	Tyr	
145					150					155					160	



Gly Arg Ile Ala Pro Ser Leu Tyr Glu Asn Gly Asp Ala Gly Met Asn  
165 170 175

Gly Ser Phe Leu Gly Asn Gln Glu Ile Gly Trp Pro Ser Ser Arg Thr  
180 185 190

Leu Asp Thr Arg Val Met Arg Arg Pro Val Ser Ser Pro Ser Trp Gln  
195 200 205

Ile Asn Pro Met Asn Val Phe Ser Gln Gly Ser Val Gly Gly Gly Arg  
210 215 220

Thr Ser Phe Ser Ser Pro Glu Ile Met Asp Thr Lys Leu Glu Ser Tyr  
225 230 235 240

Lys Gly Ile Gly Asp Ser Asn Cys Ala Leu Ser Leu Leu Ser Asn Pro  
245 250 255

His Gln Pro His Asp Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn  
260 265 270

Asn Asn Asn Thr Trp Arg Ala Ser Ser Gly Phe Gly Pro Met Thr Val  
275 280 285

Thr Met Ala Gln Pro Pro Pro Ala Pro Ser Gln His Gln Tyr Leu Asn  
290 295 300

Pro Pro Trp Val Phe Lys Asp Asn Asp Asn Asp Met Ser Pro Val Leu  
305 310 315 320

Asn Leu Gly Arg Tyr Thr Glu Pro Asp Asn Cys Gln Ile Ser Ser Gly  
325 330 335

Thr Ala Met Gly Glu Phe Glu Leu Ser Asp His His His Gln Ser Arg  
340 345 350

Arg Gln Tyr Met Glu Asp Glu Asn Thr Arg Ala Tyr Asp Ser Ser Ser  
355 360 365

His His Thr Asn Trp Ser Leu  
370 375

### 3. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
  - (A) Hossz: 859 bázispár
  - (B) Típus: nukleinsav
  - (C) Száltípus: kétszálú
  - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS-ről mRNS
- (iii) Elméleti: Nem



(iii) Antiszensz: nem

(vi) Eredeti forrás:

(A) *Arabidopsis thaliana*

(vii) Közvetlen forrás:

(B) Klón: 3B39

(xi) A szekvencia leírása: 3. számú szekvencia

TCAACATTGC TTCCTAACCA GAAATCCACC ATCATCTTCC CACGAATACA ACTTAAAGCT	60
TTACCAGAAA ATGGAGGGTC AGAGAACACA ACGCCGGGGT TACTTGAAAG ACAAGGCTAC	120
AGTCTCCAAC CTTGTTGAAG AAGAAATGGA GAATGGCATG GATGGAGAAG AGGAGGATGG	180
AGGAGACGAA GACAAAAGGA AGAAGGTGAT GGAAAGAGTT AGAGGTCCTA GCACTGACCG	240
TGTTCATCG CCACTGTGCC AGGTCGATAG GTGCCTGTT AATTTGACTG AGGCCAAGCA	300
GTATTACCGC AGACACAGAG TATGTGAAGT ACATGCAAAG GCATCTGCTG CCACTGTTGC	360
AGGGGTCAGG CAACGCTTTT GTCAACAATG CAGCAGGTTT CATGAGCTAC CAGAGTTTGA	420
TGAGCTAAA AGAAGCTGCA GGAGGCGCTT AGCTGGACAC AATGAGAGGA GGAGGAAGAT	480
CTCTGGTGAC AGTTTTGGAG AAGGGTCAGG CCGGAGAGGG TTTAGCGGTC AACTGATCCA	540
GACTCAAGAA AGAAACAGG TAGACAGGAA ACTTCCTATG ACCAACTCAT CATTTAAGGG	600
ACCACAGATC AGATAAACC TCCCGCTCTC TCTCTCTGT CATCTACATA TGCTCTATCT	660
ACACTCTTAT TAGACAAATA ATGGCATCTA ACAATGTCAA GAAAAGTTGG TCATGGTATT	720
AAATCCTAGA GGGAAATATA AGTATAAACC TTTAGTCCC TTTATGCTGT CCTGTAATGA	780
ATATCTATCC GGAATGTAT TCGCATAGTC TTGCGTCTAA TAATGTTTAT TAAAAAAAAA	840
AAAAAAAAA AAAAAAAAAA	859

#### 4. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 181 aminosav

(B) Típus: aminosav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris



(ii) A molekula típusa: fehérje

(iii) Elméleti: Nem

(iii) Antiszensz: nem

(vi) Eredeti forrás:

(A) *Arabidopsis thaliana*

(vii) Közvetlen forrás:

(B) Klón: 3B39

(xi) A szekvencia leírása: 4. számú szekvencia

Met Glu Gly Gln Arg Thr Gln Arg Arg Gly Tyr Leu Lys Asp Lys Ala  
1 5 10 15  
Thr Val Ser Asn Leu Val Glu Glu Glu Met Glu Asn Gly Met Asp Gly  
20 25 30  
Glu Glu Glu Asp Gly Gly Asp Glu Asp Lys Arg Lys Lys Val Met Glu  
35 40 45  
Arg Val Arg Gly Pro Ser Thr Asp Arg Val Pro Ser Arg Leu Cys Gln  
50 55 60  
Val Asp Arg Cys Thr Val Asn Leu Thr Glu Ala Lys Gln Tyr Tyr Arg  
65 70 75 80  
Arg His Arg Val Cys Glu Val His Ala Lys Ala Ser Ala Ala Thr Val  
85 90 95  
Ala Gly Val Arg Gln Arg Phe Cys Gln Gln Cys Ser Arg Phe His Glu  
100 105 110  
Leu Pro Glu Phe Asp Glu Ala Lys Arg Ser Cys Arg Arg Arg Leu Ala  
115 120 125  
Gly His Asn Glu Arg Arg Arg Lys Ile Ser Gly Asp Ser Phe Gly Glu  
130 135 140  
Gly Ser Gly Arg Arg Gly Phe Ser Gly Gln Leu Ile Gln Thr Gln Glu  
145 150 155 160  
Arg Asn Arg Val Asp Arg Lys Leu Pro Met Thr Asn Ser Ser Phe Lys  
165 170 175  
Gly Pro Gln Ile Arg  
180



### 5. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
  - (A) Hossz: 479 bázispár
  - (B) Típus: nukleinsav
  - (C) Száltípus: kétszálú
  - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS-ről mRNS
- (iii) Elméleti: Nem
- (iii) Antiszensz: nem
- (vi) Eredeti forrás:
  - (A) *Arabidopsis thaliana*
- (vii) Közvetlen forrás:
  - (B) Klón: 4B19
- (xi) A szekvencia leírása: 5. számú szekvencia

```
AGAAGCAGAA AGGTAAAGCT ACAAGTAGTA GTGGAGTTTG TCAGGTCGAG AGTTGTACCG      60
CGGATATGAG CAAAGCCAAA CAGTACCACA AACGACACAA AGTCTGCCAG TTTCATGCCA      120
AAGCTCCTCA TGTTCCGATC TCTGGTCTTC ACCAACGTTT CTGCCAACAA TGCAGCAGGT      180
TTCACGCGCT CAGTGAGTTT GATGAAGCCA AGCGGAGTTG CAGGAGACGC TTAGCTGGAC      240
ACAACGAGAG AAGGCGGAAA AGCACAACCTG ACTAAAGACG GTGAAACGTG TGAGATCCCG      300
GTTTGAAGGT TAATGAAACA GGCTTTGCTT ACTCTCTTCT GTCAGTCTCT TTTAGCTCCT      360
TGTAATCCTC TGTGTCTCTG TCTGTTTCTC CATATTACCT GTAATCAAAG CTATCTGCTA      420
AACCTACGAC ATGGTTAAAT AAATGCATTG AGACTTAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA      479
```

### 6. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
  - (A) Hossz: 131 aminosav
  - (B) Típus: aminosav



(C) Száلتípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: fehérje

(iii) Elméleti: Nem

(iii) Antiszensz: nem

(vi) Eredeti forás:

(A) *Arabidopsis thaliana*

(vii) Közvetlen forrás:

(B) Klón: 4B19

(xi) A szekvencia leírása: 6. számú szekvencia

Met Ser Met Arg Arg Ser Lys Ala Glu Gly Lys Arg Ser Leu Arg Glu  
1 5 10 15  
Leu Ser Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Thr Glu Asp Glu Asp Thr  
20 25 30  
Phe Glu Glu Glu Glu Ala Leu Glu Lys Lys Gln Lys Gly Lys Ala Thr  
35 40 45  
Ser Ser Ser Gly Val Cys Gln Val Glu Ser Cys Thr Ala Asp Met Ser  
50 55 60  
Lys Ala Lys Gln Tyr His Lys Arg His Lys Val Cys Gln Phe His Ala  
65 70 75 80  
Lys Ala Pro His Val Arg Ile Ser Gly Leu His Gln Arg Phe Cys Gln  
85 90 95  
Gln Cys Ser Arg Phe His Ala Leu Ser Glu Phe Asp Glu Ala Lys Arg  
100 105 110  
Ser Cys Arg Arg Arg Leu Ala Gly His Asn Glu Arg Arg Arg Lys Ser  
115 120 125  
Thr Thr Asp  
130



### 7. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 2682 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: kétszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS-ről mRNS

(iii) Elméleti: Nem

(iii) Antiszensz: nem

(vi) Eredeti forrás:

(A) *Arabidopsis thaliana*

(vii) Közvetlen forrás:

(B) Klón: 3A52

(xi) A szekvencia leírása: 7. számú szekvencia

```
GCCATTCAAG GAGACACTAA TGGTGCTCTT ACTTTGAATC TTAATGGTGA AAGTGATGCC      60
CTTTTTCCTG CCAAGAAGAC CAAATCCGGA GCCGTTTGTC AGGTCGAAAA CTGTGAAGCT      120
GATCTTAGTA AAGTTAAGGA TTATCATAGA CGCCATAAGG TCTGTGAGAT GCATTCCAAG      180
GCTACTAGTG CCACTGTCCG AGGTATCTTG CAGCGCTTTT GTCAGCAATG TAGTAGGTTC      240
CATCTTCTGC CAGGTTTCGA TGACGGAAAG AGAAGTTGTC GTAGACGTTT GGCTGGCCAT      300
AATAAACGTC CGAGGAAAAC AAATCCCGAA CCTGGCGCTA ACGGGAATCC TAGTGATGAT      360
CACTCAAGCA ACTATCTCTT GATTACTCTC TTGAAGATAC TCTCCAATAT GCATAACCAT      420
ACCGGTGATC AAGATTTGAT GTCTCATCTT CTGAAGAGCC TCGTAAGCCA TGCTGGCGAA      480
CAGTTAGGGA AAAACTTAGT TGAACCTCTT CTACAAGGAG AGATCTCAAG GTTCCTTAAA      540
ATATTGGAAA ACTCGGCTTT GCTTGGGATT GAGCAAGCTC CTCAAGAGGA GTTAAAGCAA      600
TTTTCGGCTC GGCAAGATGG GACAGCTACC GAGAACAGAT CAGAAAAACA AGTCAAAATG      660
AATGATTTTG ATTTGAATGA TATCTATATA GACTCAGATG ACACAGACGT CGAAAGATCT      720
CCTCCTCCAA CGAATCCAGC GACCAGTTCT CTTGATTATC CTTTCATGGAT ACATCAGTCT      780
AGTCCGCCTC AGACAAGTAG GAATTCAGAT TCAGCATCTG ACCAGTCACC CTCAAGTTCT      840
```



AGTGAAGATG CTCAGATGCG CACAGGCCGG ATTGTGTTCA AACTATTTGG GAAAGAGCCA 900  
AATGAATTTTCTATTGTCTT ACGAGGACAG ATTCTTGACT GGTATATCGCA TAGTCCAACT 960  
GACATGGAGA GCTACATAAG ACCTGGCTGT ATOGTATTGA CCATCTATCT TCGTCAAGCT 1020  
GAAACTGCTT GGGAAGAACT TTCAGACGAT CTGGGTTTTA GCTTAGGGAA GCTTCTAGAT 1080  
CTCTCCGATG ATCCCTTGTG GACAACCTGA TGGATTTATG TAGGGTGCAG AACCAACTTG 1140  
CATTGTGATA TAACGGTCAG GTTGTGTTG ACACTTCATT GTCTCTAAA AGTCGTGATT 1200  
ATAGTCACAT CATTAGCGTT AAACCGCTTG CTATAGCTGC AACGGAGAAG GCTCAATTTA 1260  
CAGTTAAAGG CATGAATCTC CGTCGGCGTG GCACAAGGTT ACTTTGTTCT GTTGAAGGAA 1320  
AATACTTGAT TCAGGAAACA ACACACGATT CGACGACCAG GGAGGATGAC GATTTCAAGG 1380  
ACAACAGTGA GATTGTTGAG TGTGTAAACT TCTCTTGTGA TATGCCTATA TTGAGTGGTC 1440  
GAGGATTCAT GGAGATTGAA GACCAAGCAC TCAGTAGCAG CTTCTTCCCT TTCTTAGTGG 1500  
TTGAAGATGA CGATGTTTGT TCTGAAATCC GTATACTTGA AACCACATTA GAGTTCACCTG 1560  
GAACTGATTC TGCTAAGCAA GCTATGGATT TCAATACATGA AATCGGTTGG CTTCTTCACA 1620  
GAAGTAAACT TGGGGAATCA GACCCAAATC CAGGCGTTTT CCCATTAATA CGCTTCCAGT 1680  
GGCTAATCGA GTTCTCAATG GATCGAGAGT GGTGCGCTGT GATCAGAAAG CTATTAACA 1740  
TGTCTTTTGA TGGAGCTGTT GGTGAATTTT CTTCTCTC TAATGCCACA CTGTGAGAAC 1800  
TGTGCTTCT TCACAGAGCC GTGAGGAAA ACTCTAAGCC TATGGTTGAA ATGCTCTTGA 1860  
GATATATTCC CAAGCAACAG AGAAACAGCT TGTTTAGACC CGATGCTGCT GTCCAGCCG 1920  
GCTTAACACC TCTTCATATT GCAGCTGGTA AAGACGGTTC AGAAGATGTG TTGGATGCGC 1980  
TAACAGAAGA TCCTGCAATG GTGGGGATTG AAGCGTGGAA GACATGTCGA GACAGCACAG 2040  
GCTTCACACC AGAAGACTAC GCACGCTTAC GCGTCACTT CTCATACATC CACTTGATTC 2100  
AACGCAAGAT CAATAAAAAG TCAACAACCTG AAGATCATGT TGTGGTCAAC ATCCCAGTTT 2160  
CTTTCTCAGA CAGAGAGCAG AAAGAACCAA AATCAGGTCC GATGGCTTCA GCCTTGGAGA 2220  
TCACACAGAT TCCATGCAAG CTCTGTGACC ATAACTGGT GTATGGGACA ACACGCAGGT 2280  
CTGTAGCGTA CAGACCAGCT ATGTTGTCAA TGGTGGCGAT TGCTGCGGTT TCGTCTGTG 2340  
TGGCACTTCT GTTTAAGAGT TGCCCGGAAG TGCTCTATGT GTTCAACCG TTCAGGTGGG 2400  
AGTTAATGGA CTATGGAACA AGCTGAGTGT AAGTCTACTT TGAAAGATCT TCTAAGATAT 2460  
ATATATGAAT GTTACTTATA TAAAACCATA GAGGTGTGAT TTCTATATGT AACTATATGA 2520  
GTATAAGATA TAGAGACATG TTGGAGAAGA AGATTGTTGT TATTATGTGT GTTGTGTTG 2580  
TTGTGTAATA GCCTCTCTA TCTCTCTCGA ACCTAAGGAT TCTCTCTCTG ATTAGTATAT 2640  
TTTTTGTGTTG ACAAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AA 2682



### 8. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
  - (A) Hossz: 848 aminosav
  - (B) Típus: aminosav
  - (C) Száلتípus: egyszálú
  - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: fehérje
- (iii) Elméleti: Nem
- (iii) Antiszensz: nem
- (vi) Eredeti forrás:
  - (A) *Arabidopsis thaliana*
- (vii) Közvetlen forrás:
  - (B) Klón: 3A52
- (xi) A szekvencia leírása: 8. számú szekvencia

Met	Glu	Ala	Arg	Ile	Asp	Glu	Gly	Gly	Glu	Ala	Gln	Gln	Phe	Tyr	Gly	
1			5						10					15		
Ser	Val	Gly	Asn	Ser	Ser	Asn	Ser	Ser	Ser	Ser	Cys	Ser	Asp	Glu	Gly	
		20					25						30			
Asn	Asp	Lys	Lys	Arg	Arg	Ala	Val	Ala	Ile	Gln	Gly	Asp	Thr	Asn	Gly	
		35					40					45				
Ala	Leu	Thr	Leu	Asn	Leu	Asn	Gly	Glu	Ser	Asp	Gly	Leu	Phe	Pro	Ala	
	50					55					60					
Lys	Lys	Thr	Lys	Ser	Gly	Ala	Val	Cys	Gln	Val	Glu	Asn	Cys	Glu	Ala	
65					70					75					80	
Asp	Leu	Ser	Lys	Val	Lys	Asp	Tyr	His	Arg	Arg	His	Lys	Val	Cys	Glu	
			85						90					95		
Met	His	Ser	Lys	Ala	Thr	Ser	Ala	Thr	Val	Gly	Gly	Ile	Leu	Gln	Arg	
			100					105						110		
Phe	Cys	Gln	Gln	Cys	Ser	Arg	Phe	His	Leu	Leu	Pro	Gly	Phe	Asp	Asp	
		115					120					125				
Gly	Lys	Arg	Ser	Cys	Arg	Arg	Arg	Leu	Ala	Gly	His	Asn	Lys	Arg	Pro	
	130						135					140				



Arg Lys Thr Asn Pro Glu Pro Gly Ala Asn Gly Asn Pro Ser Asp Asp  
145 150 155 160

His Ser Ser Asn Tyr Leu Leu Ile Thr Leu Leu Lys Ile Leu Ser Asn  
165 170 175

Met His Asn His Thr Gly Asp Gln Asp Leu Met Ser His Leu Leu Lys  
180 185 190

Ser Leu Val Ser His Ala Gly Glu Gln Leu Gly Lys Asn Leu Val Glu  
195 200 205

Leu Leu Leu Gln Gly Arg Arg Ser Gln Gly Ser Leu Asn Ile Gly Asn  
210 215 220

Ser Ala Leu Leu Gly Ile Glu Gln Ala Pro Gln Glu Glu Leu Lys Gln  
225 230 235 240

Phe Ser Ala Arg Gln Asp Gly Thr Ala Thr Glu Asn Arg Ser Glu Lys  
245 250 255

Gln Val Lys Met Asn Asp Phe Asp Leu Asn Asp Ile Tyr Ile Asp Ser  
260 265 270

Asp Asp Thr Asp Val Glu Arg Ser Pro Pro Pro Thr Asn Pro Ala Thr  
275 280 285

Ser Ser Leu Asp Tyr Pro Ser Trp Ile His Gln Ser Ser Pro Pro Gln  
290 295 300

Thr Ser Arg Asn Ser Asp Ser Ala Ser Asp Gln Ser Pro Ser Ser Ser  
305 310 315 320

Ser Glu Asp Ala Gln Met Arg Thr Gly Arg Ile Val Phe Lys Leu Phe  
325 330 335

Gly Lys Glu Pro Asn Glu Phe Pro Ile Val Leu Arg Gly Gln Ile Leu  
340 345 350

Asp Trp Leu Ser His Ser Pro Thr Asp Met Glu Ser Tyr Ile Arg Pro  
355 360 365

Gly Cys Ile Val Leu Thr Ile Tyr Leu Arg Gln Ala Glu Thr Ala Trp  
370 375 380

Glu Glu Leu Ser Asp Asp Leu Gly Phe Ser Leu Gly Lys Leu Leu Asp  
385 390 395 400

Leu Ser Asp Asp Pro Leu Trp Thr Thr Gly Trp Ile Tyr Val Arg Val  
405 410 415

Gln Asn Gln Leu Ala Phe Val Tyr Asn Gly Gln Val Val Val Asp Thr  
420 425 430

Ser Leu Ser Leu Lys Ser Arg Asp Tyr Ser His Ile Ile Ser Val Lys  
435 440 445

Pro Leu Ala Ile Ala Ala Thr Glu Lys Ala Gln Phe Thr Val Lys Gly  
450 455 460

Met Asn Leu Arg Arg Arg Gly Thr Arg Leu Leu Cys Ser Val Glu Gly  
465 470 475 480



Lys Tyr Leu Ile Gln Glu Thr Thr His Asp Ser Thr Thr Arg Glu Asp  
485 490 495

Asp Asp Phe Lys Asp Asn Ser Glu Ile Val Glu Cys Val Asn Phe Ser  
500 505 510

Cys Asp Met Pro Ile Leu Ser Gly Arg Gly Phe Met Glu Ile Glu Asp  
515 520 525

Gln Gly Leu Ser Ser Ser Phe Phe Pro Phe Leu Val Val Glu Asp Asp  
530 535 540

Asp Val Cys Ser Glu Ile Arg Ile Leu Glu Thr Thr Leu Glu Phe Thr  
545 550 555 560

Gly Thr Asp Ser Ala Lys Gln Ala Met Asp Phe Ile His Glu Ile Gly  
565 570 575

Trp Leu Leu His Arg Ser Lys Leu Gly Glu Ser Asp Pro Asn Pro Gly  
580 585 590

Val Phe Pro Leu Ile Arg Phe Gln Trp Leu Ile Glu Phe Ser Met Asp  
595 600 605

Arg Glu Trp Cys Ala Val Ile Arg Lys Leu Leu Asn Met Phe Phe Asp  
610 615 620

Gly Ala Val Gly Glu Phe Ser Ser Ser Ser Asn Ala Thr Leu Ser Glu  
625 630 635 640

Leu Cys Leu Leu His Arg Ala Val Arg Lys Asn Ser Lys Pro Met Val  
645 650 655

Glu Met Leu Leu Arg Tyr Ile Pro Lys Gln Gln Arg Asn Ser Leu Phe  
660 665 670

Arg Pro Asp Ala Ala Gly Pro Ala Gly Leu Thr Pro Leu His Ile Ala  
675 680 685

Ala Gly Lys Asp Gly Ser Glu Asp Val Leu Asp Ala Leu Thr Glu Asp  
690 695 700

Pro Ala Met Val Gly Ile Glu Ala Trp Lys Thr Cys Arg Asp Ser Thr  
705 710 715 720

Gly Phe Thr Pro Glu Asp Tyr Ala Arg Leu Arg Gly His Phe Ser Tyr  
725 730 735

Ile His Leu Ile Gln Arg Lys Ile Asn Lys Lys Ser Thr Thr Glu Asp  
740 745 750

His Val Val Val Asn Ile Pro Val Ser Phe Ser Asp Arg Glu Gln Lys  
755 760 765

Glu Pro Lys Ser Gly Pro Met Ala Ser Ala Leu Glu Ile Thr Gln Ile  
770 775 780

Pro Cys Lys Leu Cys Asp His Lys Leu Val Tyr Gly Thr Thr Arg Arg  
785 790 795 800

Ser Val Ala Tyr Arg Pro Ala Met Leu Ser Met Val Ala Ile Ala Ala  
805 810 815



Val Cys Val Cys Val Ala Leu Leu Phe Lys Ser Cys Pro Glu Val Leu  
820 825 830  
Tyr Val Phe Gln Pro Phe Arg Trp Glu Leu Leu Asp Tyr Gly Thr Ser  
835 840 845

### 9. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 576 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: kétszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: cDNS-ről mRNS

(iii) Elméleti: Nem

(iii) Antiszensz: nem

(vi) Eredeti forrás:

(A) *Arabidopsis thaliana*

(vii) Közvetlen forrás:

(B) Klón: 4B11

(xi) A szekvencia leírása: 9. számú szekvencia

```
CAGCGAAGA GCTCACCGT GAAGAGAGGA ATCTCCTCTC TGITGCTTAC AAAAACGTGA 60
TCGGATCTCT ACGCGCCGCC TGGAGGATCG TGTCTTCGAT TGAGCAGAAG GAAGAGAGTA 120
GGAAGAACGA CGAGCACGTG TCGCTTGTCA AGGATTACAG ATCTAAAGTT GAGTCTGAGC 180
TTTCTTCTGT TTGCTCTGGA ATCCTTAAGC TCCTTGACTC GCATCTGATC CCATCTGCTG 240
GAGCGAGTGA GTCTAAGGTC TTTTACTTGA AGATGAAAGG TGATTATCAT CGGTACATGG 300
CTGAGTTTAA GTCTGGTGAT GAGAGGAAAA CTGCTGCTGA AGATACCATG CTCGCTTACA 360
AAGCAGCTCA GGATATCGCA GCTGCCGATA TGGCACCTAC TCATCCGATA AGGCTTGCTC 420
TGGCCCTGAA TTTCTCAGTG TTCTACTATG AGATTCTCAA TTCTTCAGAC AAAGCTTGTA 480
ACATGGCCAA ACAGGCTTTT GAGGAAGCCA TAGCTGAGCT TGACACTCTG GGAGAAGAAT 540
CCTACAAAGA CAGCACTCTC ATAATGCAGT TGCTGA 576
```



10. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 248 aminosav

(B) Típus: aminosav

(C) Száلتípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: fehérje

(iii) Elméleti: Nem

(iii) Antiszensz: nem

(vi) Eredeti forrás:

(A) *Arabidopsis thaliana*

(vii) Közvetlen forrás:

(B) Klón: 4B11

(xi) A szekvencia leírása: 10. számú szekvencia

Met Ala Ala Thr Leu Gly Arg Asp Gln Tyr Val Tyr Met Ala Lys Leu  
1 5 10 15  
Ala Glu Gln Ala Glu Arg Tyr Glu Glu Met Val Gln Phe Met Glu Gln  
20 25 30  
Leu Val Thr Gly Ala Thr Pro Ala Glu Glu Leu Thr Val Glu Glu Arg  
35 40 45  
Asn Leu Leu Ser Val Ala Tyr Lys Asn Val Ile Gly Ser Leu Arg Ala  
50 55 60  
Ala Trp Arg Ile Val Ser Ser Ile Glu Gln Lys Glu Glu Ser Arg Lys  
65 70 75 80  
Asn Asp Glu His Val Ser Leu Val Lys Asp Tyr Arg Ser Lys Val Glu  
85 90 95  
Ser Glu Leu Ser Ser Val Cys Ser Gly Ile Leu Lys Leu Leu Asp Ser  
100 105 110  
His Leu Ile Pro Ser Ala Gly Ala Ser Glu Ser Lys Val Phe Tyr Leu  
115 120 125  
Lys Met Lys Gly Asp Tyr His Arg Tyr Met Ala Glu Phe Lys Ser Gly  
130 135 140



Asp Glu Arg Lys Thr Ala Ala Glu Asp Thr Met Leu Ala Tyr Lys Ala  
145 150 155 160

Ala Gln Asp Ile Ala Ala Ala Asp Met Ala Pro Thr His Pro Ile Arg  
165 170 175

Leu Gly Leu Ala Leu Asn Phe Ser Val Phe Tyr Tyr Glu Ile Leu Asn  
180 185 190

Ser Ser Asp Lys Ala Cys Asn Met Ala Lys Gln Ala Phe Glu Glu Ala  
195 200 205

Ile Ala Glu Leu Asp Thr Leu Gly Glu Glu Ser Tyr Lys Asp Ser Thr  
210 215 220

Leu Ile Met Gln Leu Leu Arg Asp Asn Leu Thr Leu Trp Thr Ser Asp  
225 230 235 240

Met Gln Glu Gln Met Asp Glu Ala  
245

### 11. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
  - (A) Hossz: 659 bázispár
  - (B) Típus: nukleinsav
  - (C) Száltípus: kétszálú
  - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS-ről mRNS
- (iii) Elméleti: Nem
- (iii) Antiszensz: nem
- (vi) Eredeti forrás:
  - (A) *Arabidopsis thaliana*
- (vii) Közvetlen forrás:
  - (B) Klón: 4A24
- (xi) A szekvencia leírása: 11. számú szekvencia

```
CGCGCCACC GCGATGTACG TGATCTACCA CCTCGTCCG CCGTCGTTCT CCGTCCCGTC 60
AATAAGAATC AGCCGGGTGA ACCTAACAAC CTCCTCTGAT TCCTCCGTCT CTCATCTCTC 120
TTCTTCTTTC AACTTCACTC TAATCTCAGA GAATCCAAC CAACACCTCT CTTTCTCTTA 180
```



CGATCCTTTC ACCGTCACCG TTAATTCAGC TAAATCCGGT ACGATGCTCG GTAACGGAAC 240  
TGTTCTCTGCT TTCTTCAGCG ATAACGGTAA CAAACTTCG TTTCACGGCG TGATCGCTAC 300  
GTCTACAGCG GCGCGTGAGT TAGATCCGGA TGAAGCTAAG CATCTGAGAT CAGATCTGAC 360  
GCGCGCGCGT GTAGGATATG AGATCGAGAT GAGAACTAAA GTGAAGATGA TAATGGGGAA 420  
GCTGAAGAGT GAAGGAGTAG AGATCAAAGT GACATGTTGA AGGATTTGAA GGAACTATAC 480  
CAAAGGTAA AACTCCAATT GTAGCTACTT CTAAAAAAC TAAGTGTAAG TCTGATCTTA 540  
GTGTCAAGTC TGGAAATGGA TTCTAAAGG AATTGATAA TTTCACATTG AAATTCTATA 600  
TATCTCICTT TTTCTCTGGA TTTGTGAAAC TTTGGATGAT CAAAGAATTC TTCATTGTC 659

## 12. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 174 aminosav

(B) Típus: aminosav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: fehérje

(iii) Elméleti: Nem

(iii) Antiszensz: nem

(vi) Eredeti forrás:

(A) *Arabidopsis thaliana*

(vii) Közvetlen forrás:

(B) Klón: 4A24

(xi) A szekvencia leírása: 12. számú szekvencia

Arg Ile Cys Cys Cys Cys Phe Trp Ser Ile Leu Ile Ile Leu Ile Leu  
1 5 10 15  
Ala Leu Met Thr Ala Ile Ala Ala Thr Ala Met Tyr Val Ile Tyr His  
20 25 30  
Pro Arg Pro Pro Ser Phe Ser Val Pro Ser Ile Arg Ile Ser Arg Val  
35 40 45  
Asn Leu Thr Thr Ser Ser Asp Ser Ser Val Ser His Leu Ser Ser Phe  
50 55 60



Phe Asn Phe Thr Leu Ile Ser Glu Asn Pro Asn Gln His Leu Ser Phe  
65 70 75 80  
Ser Tyr Asp Pro Phe Thr Val Thr Val Asn Ser Ala Lys Ser Gly Thr  
85 90 95  
Met Leu Gly Asn Gly Thr Val Pro Ala Phe Phe Ser Asp Asn Gly Asn  
100 105 110  
Lys Thr Ser Phe His Gly Val Ile Ala Thr Ser Thr Ala Ala Arg Glu  
115 120 125  
Leu Asp Pro Asp Glu Ala Lys His Leu Arg Ser Asp Leu Thr Arg Ala  
130 135 140  
Arg Val Gly Tyr Glu Ile Glu Met Arg Thr Lys Val Lys Met Ile Met  
145 150 155 160  
Gly Lys Leu Lys Ser Glu Gly Val Glu Ile Lys Val Thr Cys  
165 170

### 13. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
  - (A) Hossz: 584 bázispár
  - (B) Típus: nukleinsav
  - (C) Száltípus: kétszálú
  - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS-ről mRNS
- (iii) Elméleti: Nem
- (iii) Antiszensz: nem
- (vi) Eredeti forrás:
  - (A) *Arabidopsis thaliana*
- (vii) Közvetlen forrás:
  - (B) Klón: 3B76
- (xi) A szekvencia leírása: 13. számú szekvencia

```
CCTCCAATC CAGGCCAGCC AACAAAAGAA CCTACATTTA TTCCAGTGGT TGTTGGTCTT 60
TTGGACTCAA GTGGGAAAGA CATTACTCTT TCCTCTGTTC ATTATGATGG TACAGTGCAG 120
ACCATTTTCAG GCAGCAGCAC AATACTTCGA GTGACAAGAA ACAAGAAGAG TTTGTGTTTT 180
```



CTGATATAACC AGAAAGACCT GTTCCGTCCC TATTTAGGGG ATTCAGCCCC AGTTCGTGTT 240  
GAAACTGATC TCTCTAATGA TGACTTATTC TTCTCTCTAG CACATGATTC AGATGAATTC 300  
AATAGGTGGG AGGCCGGTCA AGTTCTGGCA AGAAAGCTGA TGCTGAACTT AGTTTCTGAT 360  
TTCCAGCAAA ATAAACCGTT GGCTCTAAAC CCAAAATTTG TGCAAGGTCT CGGCAGTGTG 420  
CTTCTGACT CAAGCTTGA CAAGGAATTT ATAGCCAAAG CAATAACACT ACCTGGGGAG 480  
GGAGAGATAA TGGACATGAT GGCCGTGGCG GATCCTGATG CTGTTCAIGC TGTTAGAAAG 540  
TTTGTACGAA AGCAGCTTGC ATCTGAACTT AAGGAGGAGC TTCT 584

#### 14. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 283 aminosav

(B) Típus: aminosav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: fehérje

(iii) Elméleti: Nem

(iii) Antiszensz: nem

(vi) Eredeti forrás:

(A) *Arabidopsis thaliana*

(vii) Közvetlen forrás:

(B) Klón: 3B76

(xi) A szekvencia leírása: 14. számú szekvencia

Pro Pro Thr Pro Gly Gln Pro Thr Lys Glu Pro Thr Phe Ile Pro Val  
1 5 10 15  
Val Val Gly Leu Leu Asp Ser Ser Gly Lys Asp Ile Thr Leu Ser Ser  
20 25 30  
Val His Tyr Asp Gly Thr Val Gln Thr Ile Thr Gly Ser Ser Thr Ile  
35 40 45  
Leu Arg Val Thr Lys Lys Gln Glu Glu Phe Val Phe Ser Asp Ile Pro  
50 55 60



Glu Arg Pro Val Pro Ser Leu Phe Arg Gly Phe Ser Ala Pro Val Arg  
65 70 75 80  
Val Glu Thr Asp Leu Ser Asn Asp Asp Leu Phe Phe Leu Leu Ala His  
85 90 95  
Asp Ser Asp Glu Phe Asn Arg Trp Glu Ala Gly Gln Val Leu Ala Arg  
100 105 110  
Lys Leu Met Leu Asn Leu Val Ser Asp Phe Gln Gln Asn Lys Pro Leu  
115 120 125  
Ala Leu Asn Pro Lys Phe Val Gln Gly Leu Gly Ser Val Leu Ser Asp  
130 135 140  
Ser Ser Leu Asp Lys Glu Phe Ile Ala Lys Ala Ile Thr Leu Pro Gly  
145 150 155 160  
Glu Gly Glu Ile Met Asp Met Met Ala Val Ala Asp Pro Asp Ala Val  
165 170 175  
His Ala Val Arg Lys Phe Val Arg Lys Gln Leu Ala Ser Glu Leu Lys  
180 185 190  
Glu Glu Leu Lys Ile Val Glu Asn Asn Arg Ser Thr Glu Ala Tyr Val  
195 200 205  
Phe Asp His Ser Asn Met Ala Arg Arg Ala Leu Lys Asn Thr Ala Leu  
210 215 220  
Ala Tyr Leu Ala Ser Leu Glu Asp Pro Ala Tyr Met Gly Thr Cys Thr  
225 230 235 240  
Glu Arg Ile Gln Gly Gly His Gln Phe Asp Arg Pro Ile Cys Cys Phe  
245 250 255  
Gly Thr Leu Ser Gln Asn Pro Gly Lys Thr Arg Glu Arg Thr Phe Leu  
260 265 270  
Pro Asp Phe Tyr Glu Gln Val Ala Gly Thr Ile  
275 280

### 15. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
  - (A) Hossz: 534 bázispár
  - (B) Típus: nukleinsav
  - (C) Száltípus: kétszálú
  - (D) Topológia: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS-ről mRNS



(iii) Elméleti: Nem

(iii) Antiszensz: nem

(vi) Eredeti forrás:

(A) *Arabidopsis thaliana*

(vii) Közvetlen forrás:

(B) Klón: 4A5

(xi) A szekvencia leírása: 15. számú szekvencia

ACCAGGAGGG GAAAAAGTCT TACCCCATGG ACATCCCGGG GATTGAGTGT TACCCGAAAA	60
GGATGAAGAA TGGTATTTCCT CCGTGTGGGA CCCCATGCAC CCATTGGGAA AGCCGTGTGG	120
CGTTTTCTTT CAGGGATGAT AGAAAAGTGC TCCCTTGGGA TGGAAAGGAG GAGCCTTTAC	180
TGGTAGTGGC CGATAGGGTG AGGAATGTTG TGGAGGCTGA TGACGGGTAT TATCTCGTGG	240
TGGCTGAGAA CGGACTTAAG CTAGAGAAAG GATCAGATTT GAAGGCGAGA GAGGTGAAGG	300
AGAGTTTAGG GATGGTTGTT TTGGTGGTGA GGCCGCCAAG AGAAGATGAT GATGATTGGC	360
AGACAAGTCA TCAGAACTGG GACTGAATTA ATAGAATCAA TACTCATATG CTGTAACTGA	420
TTACGGAGTC ATCATGGTCA TGTAATAATT TTGGATAAAG GTGGTAACTT TTTGTTCTAA	480
GATACAATCA GAAACAGAGC AATATTTTTT TCTAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAA	534

### 16. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 119 aminosav

(B) Típus: aminosav

(C) Száلتípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: fehérje

(iii) Elméleti: Nem

(iii) Antiszensz: nem



(vi) Eredeti forrás:

(A) *Arabidopsis thaliana*

(vii) Közvetlen forrás:

(B) Klón: 4A5

(xi) A szekvencia leírása: 16. számú szekvencia

```
Met Asp Ile Pro Gly Ile Glu Cys Tyr Pro Lys Arg Met Lys Asn Gly
1           5           10           15
Ile Pro Pro Ser Trp Thr Pro Cys Thr His Trp Glu Ser Arg Val Ala
20           25           30
Phe Ser Phe Arg Asp Asp Arg Lys Val Leu Pro Trp Asp Gly Lys Glu
35           40           45
Glu Pro Leu Leu Val Val Ala Asp Arg Val Arg Asn Val Val Glu Ala
50           55           60
Asp Asp Gly Tyr Tyr Leu Val Val Ala Glu Asn Gly Leu Lys Leu Glu
65           70           75           80
Lys Gly Ser Asp Leu Lys Ala Arg Glu Val Lys Glu Ser Leu Gly Met
85           90           95
Val Val Leu Val Val Arg Pro Pro Arg Glu Asp Asp Asp Asp Trp Gln
100          105          110
Thr Ser His Gln Asn Trp Asp
115
```

### 17. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 21 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

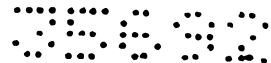
(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS (genomiális)

(iii) Elméleti: Nem

(iii) Antiszensz: nem



(vii) Közvetlen forrás:

(B) Klón: V6 primer

(xi) A szekvencia leírása: 17. számú szekvencia

ATGCTTTGCA TAACTTTGAG G

21

### 18. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 17 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: DNS (genomiális)

(iii) Elméleti: Nem

(iii) Antiszensz: nem

(vii) Közvetlen forrás:

(B) Klón: T7 primer

(xi) A szekvencia leírása: 18. számú szekvencia

AATACGACTC ACTATAG

17



## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás egy új növénygeneráció vegetatív reprodukciója valószínűségének növelésére, azzal jellemezve, hogy transzgenikusan expresszálunk egy olyan fehérjét kódoló gént, ami a szomatikus embriogenezis receptor-kináz (SERK) által beindított jelátviteli kaszkádban játszik szerepet.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kódolt fehérje fizikailag kölcsönhatásba lép a SERK-kel.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a fehérje a a Squamosa-promoter kötő fehérje (SBP) transzkripció faktorok, vagy a 14-3-3 típusú lambda fehérjék családjának tagja.

4. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a fehérje aminosav szekvenciáját a 2. számú szekvenciavázlatban, a 4. számú szekvenciavázlatban, a 6. számú szekvenciavázlatban, a 8. számú szekvenciavázlatban, a 10. számú szekvenciavázlatban, a 12. számú szekvenciavázlatban, a 14. számú szekvenciavázlatban vagy a 16. számú szekvenciavázlatban mutatjuk be, vagy aminosav szekvenciája tartalmaz egy legalább 150 aminosavból álló komponens szekvenciát, ami az illesztés után legalább 40%-os azonosságot mutat a 12. számú szekvenciával vagy a 16. számú szekvenciával.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a vegetatív reprodukció valószínűségét a magvakon keresztül fokozzuk (apomixis).



6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a magvak nem-gametifitás apomixisből származnak.

7. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a különbözőt fehérjét transzgenikusan expresszáljuk az embriózacskó közelében.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az *in vitro* szomatikus embriogenezis valószínűségét növeljük.

9. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a gén expresszióját a SERK gén promotere, a répa kitináz DcEP3-1 gén promotere, az *Arabidopsis* AtChitIV gén promotere, az *Arabidopsis* LTP-1 gén promotere, az *Arabidopsis* bel-1 gén promotere, a petúnia fbp-7 gén promotere, az *Arabidopsis* ANT gén promotere, vagy a *Phalaenopsis* O216 gén promotere szabályozza.

10. Gén, ami a 2. számú szekvenciavázlatban, a 4. számú szekvenciavázlatban, a 6. számú szekvenciavázlatban, a 8. számú szekvenciavázlatban, a 10. számú szekvenciavázlatban, a 12. számú szekvenciavázlatban, a 14. számú szekvenciavázlatban vagy a 16. számú szekvenciavázlatban bemutatott aminosav szekvenciával rendelkező fehérjét kódol, vagy egy olyan fehérjét, aminek aminosav szekvenciája tartalmaz egy legalább 150 aminosavból álló komponens szekvenciát, ami az illesztés után legalább 40%-os azonosságot mutat a 12. számú szekvenciával vagy a 16. számú szekvenciával.

11. A 10. igénypont szerinti gén, aminek a nukleotid szekvenciáját az 1. számú szekvenciavázlatban, a 3. számú szekvenciavázlatban, az 5. számú szekvenciavázlatban, a 7. számú szek-



venciavázlatban, a 9. számú szekvenciavázlatban, a 11. számú szekvenciavázlatban, a 13. számú szekvenciavázlatban vagy a 15. számú szekvenciavázlatban adjuk meg.

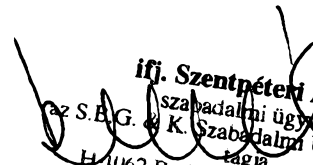
12. A 10. igénypont szerinti gén, aminek nukleotid szekvenciáját úgy módosítjuk, hogy az ismert mRNS instabilitási motívumokat vagy poliadenilezési szignálokat eltávolítjuk, és/vagy azokat a kodonokat használjuk, amiket előnyben részesít az a növény, amibe a DNS-t be akarjuk építeni.

13. Növény vagy növénysejt, ami transzgenikusan expresszálja a 10-12. igénypontok bármelyike szerinti gént.

14. Az 1. igénypont szerint előállítható növény vagy növénysejt.

63 oldal

A meghatalmazott

  
**ifj. Szentpéteri Adám**  
szabadalmi ügyvivő  
az S.B.G. és K. Szabadalmi Ügyvivői Iroda  
tagja  
H-1062 Budapest, Andrassy út 113.  
Telefon: 461-1000 Fax: 461-1099