

62.245/SZE

KIVONAT

Eljárás növényi patogének szaporodásának gátlására

A találmány szerinti eljárással növények transzformálhatók, úgy, hogy egy *Aspergillus* fajból származó glükózoxidázt expresszálganak, és ezáltal rezisztenssé váljanak bakteriális és gomba patogénekre. Ha szükséges, akkor a növények invertázt is expresszálgathatnak, hogy fokozzák a hozzáférhető glükóznak mint szubsztrátnak az enzimaktivitás számára elérhető mennyiségét.

P9601403

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

1574/96

62.245/SZE

A

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

Eljárás növényi patogének szaporodásának gátlására

A találmány tárgya eljárás növényi patogének szaporodásának gátlására egy olyan fehérjével, amelyet a fehérje előállításának céljával genetikailag módosított növényen állítunk elő, valamint a találmány tárgyat képezik a módszer során alkalmazott gének és növények.

Közismert, hogy a glükózoxidáz enzim hatására antibakteriális. Oxigén jelenlétében a glükózoxidáz katalizálja a glükóz δ -glükonolaktonná és hidrogénperoxiddá való oxidálódását. Az antibakteriális hatás köszönhető mind a hidrogénperoxid oxidatív potenciáljának, mind a δ -glükonolakton jelenlétének, amely egy jól ismert glikoziltranszferáz inhibitor.

Ennek az enzimnek az antibakteriális hatása azt eredményezte, hogy széles körben használják az élelmiszeriparban, ahol a GRAS ("Generally Recognized As Safe": általánosan biztonságosnak elismert) vegyület minősítést kapta. A glükózoxidázt arra használják, hogy megakadályozzák az elkészített élelmiszer bakteriális fertőződését. A gyógyászatban enzim hatású baktericidként használják a sebkezelő készítmények, fogpiszkálók, fogselyem és miniatűr fogkefék készítése során. A glükózoxidázt fogszuvasodást gátló anyagként is említik.

A legfrissebb közleményekben leírják, hogy a *Penicillium dangearii* által a *Verticillium dahliae* növényi patogén gomba szaporodásának gátlására alkalmazott biológiai gátlás mechanizmusában egy glükózoxidáz is szerepet játszik [Kim, K.

és mtsai.: *Phytopathology* 78, 488-492 (1988); Kim, K. és mtsai.: *Canadian Journal of Microbiology* 36, 199-205 (1990)].

A glükózoxidáznak a növények patogén mikroorganizmusokkal szembeni védekezésében való alkalmazásáról azonban azt gondolták, hogy a hatás enzimátikus természete következtében kicsik a lehetőségek. Először is, kevés szabad glükóz van jelen a növényekben. Úgy tűnik, hogy az enzimnek nincs elegendő szubsztrátja ahhoz, hogy elég hidrogénperoxidot és/vagy δ -glükonolaktont termeljen egy patogén támadás leküzdése céljából. Másodszor, egy ilyen enzim jelenléte egy növényi sejtben, mivel fogyasztja a glükózt és ha kis mennyiségben is, de hidrogénperoxidot termel, várhatóan erősen csökkentené a sejt vitalitását. A glükózoxidázt expresszáló transzgenikus növényektől nem várható, hogy normálisan fejlődjenek, akár mint regenerálódott növények, akár az ezt követő generációkban.

A jelen találmány tárgya olyan glükózoxidáz előállítás, amely biztonságosan expresszálható növényi sejtekben, és az említett sejteknek betegségekkel szembeni rezisztenciát biztosít. A jelen találmány tárgya továbbá eljárás növények transzformálására azzal a céllal, hogy glükózoxidázt expresszáljanak, amely a növényekben biztonságosan expresszálható és az említett növényeknek a betegségekkel szembeni rezisztenciát biztosít.

Meglepő módon azt találtuk, hogy az *Aspergillus niger*-ből származó glükózoxidáz gén használható növények transzformálására, amelyek a növekedés szempontjából normálisan viselkednek és ellenállnak a patogének támadásának. Ennélfogva a jelen találmány tárgya genetikai konstrukciók készítése, amelyek az *Aspergillus* glükózoxidázt (AGO) tartalmazzák, a

növényi sejtekbe való bevitelre alkalmas módon. A jelen találmány tárgyát képezi továbbá az ilyen genetikai anyagot tartalmazó, transzformált, patogén rezisztens növények készítése.

Emellett, a növények még transzformálhatók, hogy egyéb gombaellenes fehérjéket vagy inszekticid fehérjéket is expresszálgassanak, például *Bacillus thuringiensis* (B.t) géneket alkalmazva. A *Bacillus thuringiensis* gének expresszállására transzformált növényeket az EPO 0 385 962 számú bejelentésben írnak le, amely megfelel az 1990. február 12-én benyújtott 07/476,661 sorozatszámú Amerikai Egyesült Államok-beli bejelentésnek [Fischhoff, D.A. és Perlak, F.J.: "Synthetic Plant genes and method for preparation" European Patent Application, Publication Number 0 385 962 (1990)], és amelyet a továbbiakban referenciának tekintünk. Egy *Bacillus thuringiensis* gén szimultán transzformációval, szekvenciális transzformációval vagy nemesítéssel vihető be egy növénybe.

A jelen találmány tárgya tehát egy rekombináns, kétszálú DNS molekula, amely működőképes sorrendben az alábbiakat tartalmazza:

- (a) egy promoter, amely növényi sejtekben működik, és ezáltal egy RNS szekvencia létrejöttét idézi elő; és
- (b) egy strukturális kódoló szekvencia, amely az AGO termelődését kódolja;
- (c) egy 3'-nem transzlálódó régió, amely növényi sejtekben úgy működik, hogy az RNS szekvencia 3' végéhez poliadenilező nukleotidok hozzáadását eredményezi.

A jelen találmány tárgyát képezi továbbá eljárás genetikailag transzformált növények előállítására, amelyek patogénellenes mennyiségben expresszálják az AGO-t, a következő lépéseket alkalmazva:

(a) egy növényi sejt genomjába egy rekombináns, kétszálú DNS molekulát juttatunk be, amely a következő elemeket tartalmazza:

(i) egy promoter, amely a növényi sejtekben működve egy RNS szekvencia képződését idézi elő;

(ii) AGO termelést kódoló strukturális szekvencia;

(iii) egy 3' nem-transzlálódó régió, amely az említett növényi sejtekben működve poliadenilát nukleotidok hozzáadását eredményezi az RNS szekvencia 3' végéhez;

(b) transzformált növényi sejt előállítása; és

(c) genetikailag transzformált, gátló mennyiségű AGO-t expresszáló növények regenerálása a transzformált növényi sejtekből.

A jelen találmány tárgyát képezik továbbá az olyan transzformált növények, amelyek az előzőekben említett, (i), (ii) és (iii) elemeket tartalmazó DNS szekvenciát hordoznak.

A továbbiakban az "Aspergillus glükózoxidáz" vagy "AGO" szakkifejezést egy olyan glükózoxidáz megjelölésére használjuk, amely természetesen keletkezik *Aspergillus*-ban, vagy $\geq 80\%$ -os, vagy előnyösen $\geq 90\%$ -os homológiával rendelkezik az említett enzimmal, azaz például az 1. számú szekvencia által kódolt enzimmal.

A továbbiakban a "mikrobiális károkozás megakadályozása", vagy a "patogén-rezisztencia" szakkifejezést annak jelzésére alkalmazzuk, hogy csökkentjük az egy bakteriális- vagy gomba patogén által okozott kárt egy terményben.

A továbbiakban a "strukturális kódoló szekvencia" szakkifejezés egy olyan DNS szekvenciát jelöl, amely egy polipeptidet kódol, amely polipeptidet egy sejt állít elő, a DNS mRNS-sé való transzkripciója, majd a keresett polipeptiddé való transzlációja után.

A továbbiakban a "növényi lókusz" szakkifejezés azt a területet jelenti, amely közvetlenül körülveszi a növényt, beleértve a növényt és a gyökérzónáját.

A jelen találmány egy megvalósítási módja tartalmazza az *Aspergillus niger*-ből izolált fehérjét. Ezt a fehérjét, jele AGO, homogenitásig tisztítottuk. Ez a fehérje a vizsgálati körülmények között egészen kis mennyiségben (50 ng) gátolja a mezőgazdaságban lényeges gomba patogének növekedését, beleértve a *Verticillium dahliae*-t, az egyik leginkább elterjedt és káros növényi patogént, amely számos növényfaj megbetegedését okozza, a *Phytophthora infestans*-t (Pi), azt a patogént, amely a késői üszkösödést okozza burgonyában és paradicsomban, a *Botrytis cinerea*-t, amely a szürkepenészt okozza különböző gyümölcsökön és zöldségeken, a *Septoria nodorum*-ot (Sn), amely a búza pelyvafoltosságát okozza, a *Pseudocercospora herpotrichoides*-t (Ph), amely a búza csírafoltosodását okozza, valamint a *Gaeumannomyces graminis* var *tritici*-t (Cgt), amely a Take-all megbetegedés okozója a szemesterményeknél. Az is kiderült, hogy az *Erwinia carovotora*-t is gátolja, amely a burgonyák betakarítás utáni megbetegedéseinek, a burgonya

lágyrothadásnak az okozója. Várható az is, hogy képes számos egyéb növényi patogén organizmus gátlására is, a δ -glükonolaktont és hidrogénperoxidot termelő enzimaktivitása alapján. Mindegyik mellékterméke toxikus ezekre a szervezetrekre.

Számos egyéb növényfaj is megvédhető a jelen találmány szerinti módszerekkel. Például számos gyümölcs és zöldség, azaz például az eprek, burgonyák és paradicsomok megvédhetők a növényi patogénektől a jelen találmány szerinti módszerekkel. A különböző *Phytophthora* fajok patogének számos egyéb növényre, azaz például a gyümölcsfákra vagy a gyepre, és így ezek a növények is megvédhetők a jelen találmány szerinti módszerekkel. Emellett a búza és az árpa is megvédhető a jelen találmány szerinti módszerrel a Ggt-től, Sn-től és Ph-tól.

Amint az előzőekben megjegyeztük, a jelen találmány szerinti antimikrobiális fehérjék egyéb antifungális fehérjékkel kombinálva használhatók, ezzel széles spektrumú védelmet lehet biztosítani, azaz további patogének gátlását és/vagy többféle hatásmódot ugyanazon gombapatogénnel szembeni védelemre. Az egyéb antifungális fehérjék forrása lehet mikroorganizmus, azaz például a jelen találmány szerinti fehérjék, vagy lehet növény. Számos ilyen antifungális gént leírtak a szakirodalomban.

Jóllehet az AGO úgy működik, hogy megvédi a növényeket a természetes glükózszint jelenlétében, mégis kívánatos lehet egy olyan invertáz biztosítása, amely a szacharóz hidrolízisét biztosítja, és ezáltal további glükózt biztosít az AGO számára. Az invertáz előnyösen egy sejtfal invertáz, azaz például az élesztőből származó [EP 0 442 592; Willmitzer és mtsai. (1991),

az AU 70898/91 is], vagy egy vakuoláris enzim, azaz például paradicsomból vagy egyéb növényekből. Ebben a két esetben a természetes szignálszekvencia használható; azonban előnyös lehet, ha az invertázt az extracelluláris térben elkülönítjük a felhasználásig, vagy nem állítjuk elő, ameddig nincs szükség rá. Az első alternatívát úgy valósíthatjuk meg, hogy egy olyan szignálszekvenciát használunk, amely az enzimet az extracelluláris térbe irányítja. Egy ilyen szignálszekvencia a burgonya proteáz inhibitor szignálszekvencia [Keil és mtsai.: Nucleic Acids Research 14, 5641-5650 (1986); Nelson és mtsai.: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 77, 1975-1979 (1980)]. Ahhoz, hogy az invertáz expresszióját arra az időpontra korlátozzuk, amikor valóban szükség van arra, hogy az AGO számára szubsztrátot állítsunk elő, egy olyan promoter lehet hasznos, amely csak akkor aktivizálódik, amikor patogén fertőzés lép fel.

A tárolás során, amikor az *Erwinia* fertőzés a teljes tároló elvesztését okozza, a burgonyagumók természetesen tartalmaznak glükózt a keményítő lebomlása miatt. Ennélfogva nincs szükség arra, hogy egy invertáz gént építsünk be, a lágyrothadás elleni védelem céljából.

***In vitro* biológiai hatékonysági vizsgálatok**

Antifungális vizsgálatok

Az *Aspergillus niger* glükózoxidázt a Sigma Chemical Co.-tól szerezhethetjük be (St. Louis, Cat# G-7141). Ezt használjuk az *in vitro* vizsgálatban, számos mikroorganizmussal szemben.

A Pi és Bc elleni vizsgálatokat Medium #303-ban végeztük, amelyet az alábbiak szerint állítunk elő: egy liter tartalmaz 1

g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ -t, 2 g KH_2PO_4 -et, 0,5 g NaCl -t, 1 g CaCO_3 -at, 1 ml $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ törzsoldatot (1 mg/ml); 1 ml $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ törzsoldatot (1 mg/ml); 0,5 ml FeEDTA törzsoldatot (100 mmol/l); 20 g Maltrin M-100-at; 20 g kazeint; 5 g élesztőkivonatot; 5 g glükózt; 3,02 g Pipes-t 10 mmol/l, pH=6,5, majd szűréssel sterilizáljuk. A Ggt elleni vizsgálatokat fél erősségű PDA táptalajban (Difco) végezzük. A Ph elleni vizsgálatokat CDAA-ban hajtjuk végre. 1%-os táptalajt az alábbiak szerint készítünk: 35 g/l Difco Czapek Dox Broth, 1 g/l prolin, 500 mg/l aszparagin, 500 mg/l cisztein és 1 g/l agar, az oldatot 23 percig autoklávozzuk, majd szűréssel sterilizált vitaminokat adunk hozzá (1 ppm tiamin és 1 ppm biotin).

A Bc-t és a Pi-t folyadéktesztben vizsgáljuk, 96 lukas lemezekben. A Bc-t 5×10^2 spóra per luk mennyiségben használjuk, és 24-48 óráig 20 °C-on inkubáljuk. A Pi-t 5×10^3 sporangium per luk mennyiségben oltjuk le, és 24-48 óra hosszat 18 °C-on inkubáljuk. A növekedés becslését úgy végezzük, hogy 595 nm-en mérjük az OD-t. A Pi növekedése 90%-ban gátolt volt 3×10^{-5} NE/ml koncentrációban. A Bc növekedése 95%-ban gátolt volt 0,001 NE/ml koncentrációban.

A *Gaeumannomyces* elleni aktivitást szilárd agarlemezeken értékeltük. Egy körülbelül 0,5 cm² méretű agardarabot, amelyen erős gombanövekedés figyelhető meg, egy fél-erősségű PDA lemez középpontjába helyezzük, majd néhány napig hagyjuk növekedni 22 °C-on. A növekedés szélétől mért 1 cm-re aseptikusan eltávolítunk egy 0,5 cm átmérőjű agardarabot, steril dugófúró alkalmazásával. Steril AGO-t teszünk közvetlenül ezekbe a

lukakba. Látható gátlási zóna jön létre, már 0,02 NE/luk mennyiség esetében is.

A Ph elleni vizsgálatokat 96 lukas lemezeken végezzük. *Pseudocercospora herpotrichoides* var. *tritici* vizes agaron készített 14 napos tenyészetét használjuk a spóraszuszpenzió előállítására. Egy lemezt árasztunk el 5-10 ml CDAA 0.1% táptalajjal, majd a spórákat óvatos rázogatóssal belekeverjük a folyékony táptalajba. A koncentrált spóraszuszpenziót pipettával leszívjuk, és a vizsgálat végrehajtásához szükséges CDAA ösztérfogathoz adjuk hozzá, a spórák koncentrációját 100 000 spóra/ml-re állítjuk. A vizsgálatot sötétben végezzük, 24 °C-on inkubálva.

A spóraszuszpenziót 50 µl/luk mennyiségben osztjuk szét egy 96 lukas mikrotiter lemezen. Ezeket a lemezeket azután inkubátorba tesszük (10 óra/nap fényben, 12 °C) 24 órára, mielőtt a mintát felvisszük. 50 µl mintát adunk 50 µl oltóanyaghoz (ezt 24 órával korábban készítjük el), így a luk ösztérfogat: 100 µl/kezelt luk/ismételt kezelés. A vizsgáló lemezeket 48 óra hosszat inkubáljuk, majd az eredményeket az optikai sűrűség (OD) meghatározásával állapítjuk meg egy 3550-es típusú BioRad mikrotiter lemez leolvasó modellel, egyetlen hullámhosszon, 595 nm-en. OD leolvasást végzünk nulla időpontban is (t_0), amit közvetlenül a minta felvitele után végzünk, majd OD leolvasást végzünk 48 órával a minta felvitele után is (t_{48}). A gombás növekedést a t_0 és t_{48} OD leolvasások közötti különbség alapján határozzuk meg, a gomba biomasszára számított értékkel szorozva. (A gomba biomassza számított értéke a kapcsolat a gombás növekedés és az optikai sűrűség között, és külön kísérletben kell meghatározni. A

gombanövekedés és az optikai sűrűség közötti kapcsolatot úgy határozzuk meg, hogy gombákat szaporítunk 96 lukas mikrotiter lemezekre, majd a micéliumot időről időre kinyerjük, körülbelül 0,1 OD-nként. A számított érték a gomba biomassza és a gombafajra specifikus OD érték közötti lineáris kapcsolatból származik. Ez a lineáris kapcsolat iránytangense. A Ph-ra számított érték 4,91.) Ezután meghatározzuk a %-os gátlást a kezelések után kapott biomassza és a kontrollok közötti biomassza közötti különbség alapján. Az AGO a Ph-t 60%-ban gátolja $1,7 \times 10^{-4}$ NE/ μ l koncentrációban.

Az Sn elleni vizsgálatok lényegében megegyeznek a Ph elleni vizsgálatokkal, azzal az eltéréssel, hogy a spóraszuszpenziót másképpen állítjuk elő. Egy hétnapos, sporuláló *Septoria nodorum* tenyészetet (YMA agaron) használunk a spóraszuszpenzió előállítására. Kis mennyiségű (<1 ml) CDAA agartáptalajt csöppentünk a tenyészet olyan egy területére, ahol rózsaszín spóratömeg nedvedzik a pycnidiumokból. A spórákat CDAA táptalajjal keverjük össze, ismételten felszívva és kifújva a pipettázóból. A koncentrált szuszpenziót a vizsgálathoz szükséges CDAA ösztérfogathoz adjuk hozzá, a spórák koncentrációját 50 000 spóra/ml-re állítjuk. Az Sn-re számított érték 0,508. Az AGO 60%-ban gátolja az Sn-t, $1,7 \times 10^{-4}$ NE/ml koncentrációban.

Bakteriális vizsgálat

Az *Erwinia carotovora* baktérium tenyészeit PDA lemezekre szélesztve tartjuk fenn, 24 °C-on sötétben inkubálva. Az inokulum elkészítéséhez aktívan növekedő baktériumokból (5-9 nap) egy kacsnyit adunk 50 ml 1/4 erősségű PD táptalajhoz,

amely 125 ml-es Erlenmeyer lombikban található. A lombikot rázó inkubátorba tesszük (130/perc), 24 °C-ra, sötétbe. 24 óra elteltével a baktériumokat ülepítjük, steril ionmentesített vízben szuszpendáljuk, majd három-négy 100 µl-es alikvot részt teszünk egy 96-lukas mikrotiter lemez lukáiba leolvasás céljából. A mikrotiter leolvasót 595 nm-re állítjuk, majd meghatározzuk a lukák átlagos optikai sűrűségét. Ezt az abszorbancia számot (ABS=optikai sűrűség) használjuk az alábbi képletben, hogy meghatározzuk a telepkepző egységek (CFU-k) számát a fermentlében.

$$CFU = (3 \times 10^6) + [(3 \times 10^8) \times ABS] + [(5 \times 10^8) ABS^2]$$

Felhasználáshoz a fermentlé koncentrációját 10^5 CFU-ra állítjuk.

Az AGO teljesen gátolta az *Erwinia carotovora* növekedését, már 3×10^{-5} NE/µl koncentrációban is.

Enzimazonosítás

Számos különböző módszer tervezhető egy fehérje termelődésének kimutatására egy heterológ rendszerben, azaz például növényi sejtekben. Western blot technikák alkalmazhatók egy fehérje immunológiai módszerekkel való kimutatására, vagy enzimatis és vagy biológiai módszerek használhatók a fehérje aktivitásának kimutatására.

Glükózoxidáz enzimvizsgálat

Egy folytonos spektrofotometriás vizsgálat [Frederick, K. és mtsai.: Journal of Biological Chemistry 265, 3793-3802 (1990)] módosítását használjuk a glükózoxidáz aktivitás meghatározására. Pozitív kontrollként *Aspergillus niger* glükózoxi-

dázt (Sigma) használunk. A reakcióelegy 20 µg/ml tormaperoxidázt (Sigma), 0,32 mmol/l Triton X-100-zal stabilizált o-dianizidin oldatot (Sigma) és 0,1 mol/l glükózt tartalmaz 75 mmol/l nátrium-foszfát pufferben (pH=5,0). Ehhez 100 µl különböző koncentrációjú *Aspergillus niger* glükózoxidázt adunk a kontroll reakciók esetében, vagy 100 µl, heterológ forrásból származó mintát. A vizsgálatot szobahőmérsékleten végezzük, majd követjük a 460 nm-en mért abszorbancia növekedését.

Egy másik, a 4-amino-antipirin (4-AAP) reagenst használó glükózoxidáz vizsgálatot optimalizáltunk a felhasználás céljára, Gallo publikációja alapján [Gallo: Methods in Enzymology 71, 665-668 (1981)]. Az 5X 4-AAP reagenst 10 ml össztérfogatban állítjuk elő 0,68 g KH₂PO₄-et, 8,3 mg 4-AAP-t (8,03 mmol/l), 25 µl Triton X-100-at, 0,0658 g kristályos fenolt és 1000 E tormaperoxidázt használva, a pH értékét KOH-val 5,0-ra állítva. A vizsgálatot úgy hajtjuk végre, hogy ebből a 4-AAP reagensből 200 µl-t, 5 µl 1 mmol/l FAD-ot és 50 µl 1 mol/l glükózt keverünk össze; majd hozzákeverjük a vizsgált mintát (max. 750 µl). Az eredményt 508 nm-en olvassuk le.

Glükózoxidáz biológiai aktivitásának vizsgálata

4-6 napos Ggt gomba korongját friss, egynegyed erősségű burgonya-glükóz agar (PDA, Difco) lemezekre visszük át. A gombát vagy négy napig növesztjük 22 °C-on, vagy addig, amíg a növekedés átmérője körülbelül 2,5 cm. Steril dugófúróval lukakat fúrunk az agarba, 1 cm távolságban a növekedési körtől, majd 100 µl puffert vagy heterológ forrásból származó mintát

teszünk a lukakba. A gombát 24 óra hosszat szobahőmérsékleten növesztjük, majd vizsgáljuk a növekedés gátlását.

A glükózo oxidáz immunológiai kimutatása

A *Aspergillus niger* által termelt glükózo oxidáz elleni poliklonális ellenanyagok számos kereskedelmi forrásból beszerezhetők, ilyen például a Rockland, Inc., Gilbertsville, Pennsylvania.

Genetikai transzformáció

Az AGO gén klónozása

Össz-DNS-t izolálunk *Aspergillus niger*-ből (ATCC 9029), majd PCR templátként használjuk egy glükózo oxidáz gén izolálása céljából. A PCR primereket a gén publikált szekvenciája alapján készítettük [Frederick, K. és mtsai.: Journal of Biological Chemistry 265, 3793-3802 (1990); Kriechbaum, M. és mtsai.: FEBS Lett. 255, 63-66 (1989)], és úgy terveztük meg, hogy a gén teljes szekvenciáját izolálhassuk vele, beleértve a szignálszekvenciát is. Emellett, ahhoz, hogy megkönnyítsük ennek a génnek a beépülését a heterológ baktérium, bakulovírus vagy növényi sejtekben való expresszióra alkalmas vektorokba, az 5' PCR primer (3. számú szekvencia) XbaI és BglII restriktációs endonukleáz hasítási helyeket visz be a génbe, a gén ATG transzlációs kodonja elé. A 3' PCR primer (4. számú szekvencia) BamHI és KpnI restriktációs endonukleáz hasítási helyeket visz be közvetlenül a stopkodon után. A kapott PCR fragmenst pUC118 vektorba klónozzuk, egy XbaI/KpnI fragmens formájában, így kapjuk a pMON22514 vektort, majd teljesen megszekvenáljuk. A szekvencia (1. számú szekvencia) teljesen

megegyezik a publikált szekvenciával. A 2. számú szekvencia a megfelelő aminosav szekvencia.

Növényi gén készítése

Egy kétszálú DNS formájában létező növényi gén expressziója magában foglalja a hírvivő RNS (mRNS) képződését a DNS egyik száláról, RNS polimeráz enzim segítségével, majd a mRNS primer átíratának processzálását a sejtmagban. Ez a processzálas érint egy 3' nem-transzlálódó régiót, amely poliadenilát nukleotidokat ad az RNS 3' végéhez. A DNS mRNS-sé való átírását egy DNS régió szabályozza, amit általában "promoter" néven említene. A promoter régió egy olyan nukleotid szekvenciát tartalmaz, amely jelzi az RNS polimeráznak, hogy kapcsolódjon a DNS-hez és iniciálja a mRNS transzkripcióját, az egyik DNS szálát használva templatként, a megfelelő RNS szál előállítására céljából.

Számos, növényi sejtekben aktív promotert leírtak a szakirodalomban. Ezek közé tartozik a nopalin-szintetáz (NOS) és az oktopin-szintetáz (OCS) promoter (amelyeket az *Agrobacterium tumefaciens* tumort indukáló plazmidjai hordoznak), a karfiol mozaikvírus (CaMV) 19S és 35S promoterei, a görvélyfű mozaikvírus (FMV) 35S promotere, valamint a ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxiláz (ssRUBISCO, egy nagyon nagy mennyiségben előforduló növényi fehérje) fényel indukálható promotere. Mindegyik említett promotert felhasználták már különböző típusú DNS konstrukciók készítésére, amelyeket növényekben expresszáltak [5,034,322, számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés, Fraley és mtsai. (1991)], amelyet a továbbiakban referenciaként kezelünk.

Ismertek olyan promoterek, amelyek bizonyos növényi részekre korlátozzák az expressziót, vagy egy bizonyos ingerre adott válaszra korlátozzák. Például a burgonyagumó specifikus promoterek, azaz például a patatin promoterek, vagy az ADO-glükóz-pirofoszforiláz nagy vagy kis alegységének promoterei használhatók arra, hogy főleg a gumókban legyen expresszió, és így, az AGO-val kombinálva, rezisztenciát biztosít a gumókat ért támadás ellen, azaz például az *Erwinia* támadás ellen. Kíváncos lenne egy gyümölcsspecifikus promotor, hogy az eprek vagy a szőlők esetében rezisztenciát biztosítson a *Botrytis*-szel szemben. Egy gyökérspecifikus promotor lenne kíváncos, hogy a búza vagy az árpa esetében biztosítsa az AGO expresszióját, és ezzel a Ggt-vel szembeni rezisztenciát. A szakterületen jártas szakember számos ilyen növény-specifikus promotert ismer, amelyek hasznosak lehetnek a jelen találmányban.

Egy másik módszer szerint a kétszálú molekulákban alkalmazott promoterek úgy választhatók meg, hogy biztosítsák az AGO specifikus expresszióját a gombafertőzésre adott válaszként. A növények gombapatogénekkal való fertőzése nagyszámú fehérje képződését indítja be, amelyeket védekezéshez kapcsolódó vagy patogenezishez kapcsolódó (PR) fehérjéknek neveznek [Bowles, D.: Ann. Rev. of Biochem. 59, 873-907 (1990); Bol, J. és mtsai.: Annual Rev. of Phythopathol. 28, 113-138 (1990); Linthorst, H.J.M.: Crit. Rev. Plant Sci. 10, 123-150]. Az ilyen, védekezéshez kapcsolódó, vagy PR gének fenilpropanoid metabolizmus enzimeket kódolhatnak (azaz például fenilalanin ammónia-liázt, kalkon-szintetázt, 4-kumarát CoA-ligázt, kumarinsav 4-hidroxilázt), vagy olyan fehérjéket, amelyek módosítják a növényi sejtfalakat (azaz például hidroxiprolinban

gazdag glikoproteineket, glicinben gazdag fehérjéket, peroxidázokat), enzimeket (azaz például kitinázokat és glukánázokat), amelyek lebontják a gomba sejtfalet, taumatin-szerű fehérjéket, vagy ezidáig ismeretlen funkciójú fehérjéket. A védekezéshez kapcsolódó vagy PR géneket számos növényfajból izolálták és jellemezték. Ezeknek a géneknek a promoterei használhatók AGO expresszió elérésére transzgenikus növényekben, ha egy patogén, főleg egy gombapatogén azaz például Pi fertőzi meg a növényt. Az ilyen promoterek származhatnak a burgonyából magából izolált, védekezéshez kapcsolódó vagy PR génekből [Fritzemeuer, K. és mtsai.: Plant Physiol. 85, 34-41, (1987); Cuypers, B. és mtsai.: Mol. Plant-Microbe Interactions 1, 157-160 (1988); Logemann, J. és mtsai.: Plant Cell 1, 151-158 (1989); Matton, D. és Brisson, N.: Mol Plant-Microbe Interactions 2, 325-331 (1989); Taylor, J. és mtsai.: Mol. Plant-Microbe Interactions 3, 72-77 (1990); Matton, D. és mtsai.: Plant Mol. Biol. 14, 863-865 (1990); Schroder, M. és mtsai.: Plant J. 2, 161-172 (1992)]. Ahhoz, hogy az AGO gént a *P. infestans* fertőzés által indukált promoter kontrollja alá helyezzük, a Taylor és munkatársai által ismerttetett promoter lehet az előnyös [Taylor, J. és mtsai.: Mol Plant-Microbe Interactions 3, 72-77 (1990)].

A választott promoternek képesnek kell lennie arra, hogy az enzimet kódoló szekvencia megfelelő mértékű expresszióját biztosítsa, hogy ennek eredményeképpen hatékony mennyiségű AGO termelődését kapjuk.

A jelen találmány szerinti DNS konstrukciókban használt promoterek (azaz kiméra növényi gének) módosíthatók, ha szükséges, hogy ezzel befolyásoljuk a szabályozó tulajdonságaikat.

Például a CaMV 35S promotert az ssRUBISCO génnek ahhoz a részéhez ligálhatjuk, amely elnyomja az ssRUBISCO expresszióját fény hiányában, hogy olyan promotert hozzunk létre, amely aktív a növényekben, de nem aktív a gyökerekben. A kapott kiméra promotert használhatjuk az alábbiak szerint. Az ismertetés céljából a "CaMV 35S" promoter szakkifejezés jelenti a CaMV 35S promoter variációit is, azaz például azokat a promotereket, amelyek az operátor régiókkal való ligálásból, véletlenszerű vagy ellenőrzött mutagenézisből származnak, stb. Emellett, a promotereket úgy is megváltoztathatjuk, hogy többszörös "fokozó szekvenciákat" tartalmazzanak, hogy segítsük a fokozott génexpressziót. Ilyen fokozó szekvenciákat Kay és munkatársai írtak le [Kay, R. és mtsai.: Science 236, 1299-1302 (1987)].

Egy fokozott CaMV 35S promotert az alábbiak szerint állítottunk elő. A CaMV 35S promoternek egy fragmensét, amely a -343-as és a +9-es pozíciók között található, korábban pUC13-ban klónozták [Odell, J. és mtsai.: Nature 313, 810 (1985)]. Ez a szegmens egy olyan régiót tartalmaz, amelyet úgy azonosítottak, mint amelyre szükség van a CaMV 35S promoter maximális expressziójához. Egy ClaI-HindIII fragmens formájában vágtuk ki, DNS polimeráz I-gyel tompavégűvé tettük (ClaI fragmens), majd a pUC18 HincII hasítási helyére építettük be. A 35S promoternek ezt az upstream régióját egy HindIII-EcoRV fragmens formájában vágjuk ki ebből a plazmidból (a -343-as nukleotidtól a -90-es nukleotidig terjed), majd ugyanebbe a plazmidba visszük vissza a HindIII és PstI hasítási helyek közé. A fokozott CaMV 35S promoter (ezután "CaMV E35S") így a -343-as és -90-es nukleotidok közötti szekvenciát duplán tartalmazza [Kay, R. és mtsai.: Science 236, 1299-1302 (1987)].

A jelen találmány szerinti DNS konstrukcióról keletkező RNS tartalmaz még egy 5' nem-transzlálódó vezérszekvenciát. Ez a szekvencia származhat a gén expresszáálásához választott promoterből, és speciálisan módosítható, hogy fokozza a mRNS transzlációját. Az 5' nem-transzlálódó régiók megkaphatók virális RNS-ekből, megfelelő eukarióta génekből, vagy egy szintetikus génből is. A jelen találmány nem korlátozódik az olyan konstrukciókra, amelyekben a nem transzlálódó régió egy olyan 5' nem-transzlálódó szekvenciából származik, amely a promoter szekvenciát kíséri. A nem-transzlálódó vezérszekvencia inkább egy nem-rokon promoterből vagy kódoló szekvenciából származhat. Például a petúnia 70-es hősokk fehérjéje (Hsp70) tartalmaz egy ilyen vezérszekvenciát [Winter és mtsai.: Molecular and General Genetics 221(2), 315-319 (1988)] .

Amint az előzőekben megjegyeztük, a jelen találmány szerinti kiméra növényi gének tartalmazznak egy poliadenilezési szignált, amely úgy működik a növényekben, hogy adenilát nukleotidok hozzáadását okozza az RNS 3' végéhez. Az előnyös 3' régiók lehetnek például az alábbiak: (1) a 3' átírt, nem-transzlálódó régiók, amelyek az *Agrobacterium* tumorindukáló (Ti) plazmid gének poliadenilát szignálját tartalmazzák, azaz például a nopalin-szintetáz (NOS) génét, és (2) növényi gének, mint például a szójabab 7s tartalék fehérje génjei és a borsó ssRUBISCO E9 génje [Fischhoff, D.A. és Perlak, F.J.: "Synthetic plant genes and method for preparation" European Patent Application, Publication Number 0 385 962 (1990)] .

Növényi transzformáció és expresszió

Egy kiméra növényi gént, amely a jelen találmány szerinti struktúrális kódoló szekvenciát tartalmazza, bármely ismert

módszerrel beépíthetünk egy növénybe. Az alkalmas növényi transzformációs vektorok közé tartoznak az *Agrobacterium tumefaciens* Ti plazmidjából származó vektorok, valamint a szakirodalomban közöltek is [Herrera-Estrella, L. és mtsai.: Nature 303, 20-9 (1983); Bevan, M. és mtsai.: Nature 304, 184 (1983); Klee, H.J. és mtsai.: Bio/Technology 3, 637-642 (1985); és a 0 120 516 számú EPO publikáció, Schilperoort és mtsai.] Az *Agrobacterium* Ti- vagy gyökérindukáló (Ri) plazmidjaiból származó növényi transzformációs vektorok mellett alternatív módszerek is használhatók arra, hogy a jelen találmány szerinti DNS konstrukciókat bevigyük növényi sejtekbe. Az ilyen módszerek közé tartozik például a liposzómák, az elektroporáció, a szabad DNS felvételét fokozó vegyszerek alkalmazása, a szabad DNS bejuttatása mikorészecske bombázással, és a vírusokkal vagy virággporral végzett transzformáció.

A jelen találmány szerint megvédhető növények közé tartoznak, anélkül hogy ezekre korlátoznánk magunkat, az alábbiak: burgonyák, paradicsomok, búza, kukorica, eprek, szőlők, valamint a különböző dísnövények. Az ilyen típusú növényeknél a szövettenyésztési módszerek és a növényregenerálás is meg vannak oldva.

A glükóioxidáz tranziens expressziója dohánynövényekben

A kétszikű növények transzformációjára különösen jól használható plazmid kazetta vektor a pMON999. A pMON expressziós kazetta tartalmazza a CaMV E35S promotert, valamint a 3' véget, vele a NOS gén poliadenilezési szignálját. A pMON999 tartalmaz BglII, KpnI és EcoRI hasítási helyeket a kódoló szekvenciák beépítésére, valamint NotI-NotI hasítási

helyeket, amelyek közreveszik a növényi gén expressziós kazettát.

A pMON22514-nak az AGO kódoló régiót tartalmazó BglII/KpnI fragmensét a pMON999-be építjük be, így kapjuk a pMON22515 vektort. A pMON22515 vektort dohány protoplasztokba elektroporáljuk. A transzformált dohánysejtek által expresszált glükózoxidáz jelenlétét Western blot elemzéssel valamint enzimatiskus elemzéssel erősítjük meg.

Kétszikűek stabil transzformációja

Az AGO-hoz ingázó vektort úgy készítünk, hogy az AGO kódoló régiót egy BamHI/BglII fragmens formájában kivágjuk a pMON22515 vektorból. Ezt azután egy pUC alapú vektorba tesszük, és a kapott plazmid, a pMON22515 tartalmazza az FMV promotert, az AGO kódoló régiót és a 3' véget, beleértve a NOS génből származó poliadenilezési szignált. Az ebből a vektorból származó NotI/NotI fragmenst, amely tartalmazza az FMV promotert, az AGO kódoló régiót és a NOS gén 3' végét, a pMON17227 vektor (WO 92/0449, Barry és munkatársai) NotI hasítási helyére építjük be, így kapjuk a végleges Ti vektort, a pMON22587-et.

Amint az előzőekben említettük, egy AGO gén egy növény specifikus részeiben is expresszálható, szövet-specifikus promoterek alkalmazásával. A patatin promoter elsősorban a burgonya gumójában expresszálódik. Az AGO kódoló régióját tartalmazó KpnI/XbaI fragmenst kivágjuk a pMON22514 vektorból és beépítjük egy pUC alapú vektorba, amely a patatin 1.0 promotert tartalmazza [Bevan, M. és mtsai.: Nature 304, 184 (1983)], majd a NOS génből származó poliadenilezési szignál 3' végét vágjuk

ki, így állítjuk elő a pMON22516 vektort. A pMON22516 vektor NotI fragmense, amely tartalmazza a patatin promotert, az AGO kódoló régiót és a NOS gén 3' végét, beleértve a poliadenilezési szignált is, azután a pMON17227 vektor NotI hasítási helyére építjük be, így kapjuk a Ti plazmid vektort, a pMON22517-et.

Ezeket a vektorokat bevihetjük ártalmatlanná tett *Agrobacterium* ABI sejtekbe, és burgonya, paradicsom, vagy egyéb szövettenyészetben levő explantumok transzformálására használhatjuk. Kanamicin vagy glifozát rezisztencia alapján végzett szelekció és a növények regenerálása után AGO-t tartalmazó teljes növények állíthatók elő. A glükózoxidáz expresszióját megerősíthetjük Western blot elemzéssel, enzimvizsgálattal vagy biológiai vizsgálattal.

Az AGO expressziója transzformált burgonya növényekben

A pMON22157 Ti plazmid vektorral transzformált burgonyanövények gumóiból kivonjuk a fehérjét, majd Western blottal megvizsgáljuk a glükózoxidáz jelenlétét. Néhány növényben magas szintű glükózoxidáz expressziót lehetett kimutatni. Ezeket az expressziós szinteket enzimvizsgálatokkal is megerősítettük, a 4-amino-antipirin rendszert használva. Az összfehérjét úgy vonjuk ki a ezekből a gumókból, hogy 25 mmol/l foszfát puffer (pH=7,0) + 5 mmol/l EDTA + 100 mmol/l KCl összetételű oldatban eldörzsöljük őket.

Az AGO-t expresszáló gumókból kivont fehérjét *P. infestans*-szal szemben vizsgáljuk a 96 lukas vizsgáló eljárásban, 12,5 mmol/l koncentrációjú foszfát pufferben (pH=7,0). Az eredményeket az 1. táblázatban mutatjuk be. A fehérje

legmagasabb vizsgált szintjén ($21 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), a Pi spórák nem csíráztak ki, vagy a spórákból való növekedés erősen satnya volt, ha az üres vektorral (pMON17227) vagy puffer kontroll növényi kivonatokkal hasonlítjuk össze.

1. Táblázat

<u>Kezelés</u>	<u>Gombagátlás*</u>
Puffer kontroll	0
Üres vektor kontroll	2
pMON22517, 9-es vonal	3
pMON22517, 30-as vonal	3

*Skála: 0=nincs gátlás, 1=enyhe gátlás, 2=közepes gátlás, 3=erős gátlás.

A pMON22587 Ti plazmid vektorral transzformált burgonyanövények leveleit megvizsgáljuk, hogy tartalmazznak-e AGO-t, enzimatikus vizsgálat alapján. Az eredményeket a 2. táblázatban láthatjuk. Csakúgy mint az előzőkben, a pMON17227-tel transzformált burgonyanövényeket használjuk üres vektor kontroll növényekként.

2. Táblázat

	Expresszió szint ^a	Glükózo oxidáz aktivitás ^b	Megfelel
<u>Vonal#</u>	<u>%</u>	<u>(E/10 ng$\times$10⁻⁴)</u>	<u>(E/gFW)-nek^c</u>
Rus. bur.	0	0	0
22587-2	0,075	72,2	7,22
22587-3	0,150	126,4	12,64
22587-4	0,007	6,0	0,6
22587-12	0,125	88,2	8,82

22587-31	0,350	140,4	14,04
22587-32	0,350	121,0	12,10
22587-33	0,450	181,8	18,18
22587-34	0,003	1,2	0,12

a Az expressziós szintet a glükóioxidáznak az összes kivonható levélfehérje százalékában fejezzük ki.

b A levélkivonatokban levő glükóioxidáz aktivitását enzimaktivitás vizsgálattal határozzuk meg és az összfehérjében levő enzimaktivitás egységei alapján számítjuk ki.

c A glükóioxidáz aktivitás egységei per gramm nedves súlyú levélszövet egységet az összfehérjében levő aktivitás alapján számítjuk ki, az alábbi konverziós faktorról; 10 µg összfehérje per gramm friss nedves súlyú levélszövet.

A pMON22587 Ti plazmid vektorral transzformált burgonyanövények leveleit is megvizsgáljuk, hogy tartalmazzak-e H_2O_2 -t, a titánklorid kicsapásos módszer alkalmazásával. Két vonalnál kiderült, hogy a levelekben a H_2O_2 szint kétszer-négyszer magasabb mint a nem-transzformált kontroll növényben.

Betegség-rezisztens burgonyák

Az AGO-t expresszáló gumókat megvizsgáltuk *Erwinia carotovora* ellen, egy gumókorong vizsgálatban. 34, pMON22517 plazmiddal transzformált vonalból származó gumót vizsgálunk meg a lágyrothadásos léziókkal szembeni rezisztenciára. A vonalakban megvizsgáltuk még az expresszió szintjét is, Western blot elemzéssel. A gumókat a felszínükön sterileztük, Yang és

munkatársai módszere alapján (1989). Vonalanként két-három gumót aszeptikus körülmények között 7-10 mm vastag korongokra vágunk szét, így kapunk vonalanként hat-tizenkét korongot. A korongokat nedvesített steril Whatman #1 szűrőpapírra tesszük, Petri csészében. Minden egyes korong közepét 50,000 CFU-val oltjuk be, 10 μ l térfogatban. A korongokat magas nedvességtartalmú környezetben tartjuk 3 napig, 23 °C-on. A betegség értékelése magában foglalja a keletkező léziók hosszának, sugarának és mélységének mérését. A lézióból származó macerált szövetből készített hígításokat használjuk a baktériumok léziónkénti végleges számának meghatározására. Ennek a meghatározásnak az eredményeit a 3. táblázatban mutatjuk be. Azoknál a vonalaknál, amelyek a legjobban védettnek bizonyultak, mindegyik mért paraméter jobb volt mint az üres vektorral vagy a puffer kontroll gumókkal kapott paraméterek. Általában azoknál a gumóknál találtuk a léziókban a legalacsonyabb baktériumszintet, amelyek a legmagasabb szinten expresszálták az AGO-t.

3. Táblázat

<u>Vonal#</u>	Expresszió ^b	
	<u>szintek</u>	<u>CFUx10⁹</u>
Puffer kontroll	nulla	16,76
Üres vektor	nulla	14,32
22517-10	nulla	20,7
22517-24	nulla	20,09
22517-13	nulla	16,3
22517-12	nulla	19,26
22517-9	ALACSONY	9,34

22517-28	ALACSONY	13,56
22517-33	ALACSONY	9,57
22517-14	ALACSONY	8,22
22517-17	ALACSONY	8,36
22517-19	ALACSONY	9,37
22517-32	ALACSONY	7,17
22517-20	ALACSONY	7,4
22517-21	ALACSONY	6,25
22517-34	ALACSONY	4,44
22517-11	ALACSONY	3,06
22517-8	ALACSONY	1,5
22517-7	KÖZEPES	12,88
22517-31	KÖZEPES	12,06
22517-1	KÖZEPES	7,54
22517-15	KÖZEPES	6,7
22517-25	KÖZEPES	12,25
22517-35	KÖZEPES	6,81
22517-2	KÖZEPES	3,52
22517-3	KÖZEPES	1,26
22517-5	KÖZEPES	1,4
22517-6	MAGAS	15,74
22517-18	MAGAS	2,675
22517-26	MAGAS	4,55
22517-29	MAGAS	4,35
22517-4	MAGAS	4,2
22517-30	MAGAS	3,92
22517-16	MAGAS	1,12
22517-23	MAGAS	2,67
22517-36	MAGAS	0,855

^aCFU = telepképző egység

^bAz expressziós szinteket Western blot elemzéssel határoztuk meg.

pMON22587-tel transzformált és AGO-t expresszáló növényekből származó leveleknek vizsgáljuk a Pi rezisztenciáját. A teljesen kiterjedt (kb. 20 cm²) leveleket beoltjuk, 100 µl-es cseppeket adva *Phytophthora infestans* sporangium szuszpenziójából az abaxiális levélfelszínre. Az oltóanyag koncentrációja 10⁵-10⁶ sporangium per ml, amit LB-V8 táptalajt tartalmazó, 2-3 hetes lemezekről gyűjtöttünk. A beoltott leveleket Nunc Bio-Assay lemezeken tartjuk (243x243x18 cm), a megfelelő nedvességet az aljára tett nedves szűrőpapírral biztosítjuk, majd növesztő kamrákban inkubáljuk körülbelül 19 °C-on, 16 órás fotoperiódussal. A tünetek kifejlődését megfigyeljük, majd a leveleken levő fertőzött területeket úgy mérjük le, hogy minden egyes levelet egy 5 x 5 mm-es, átlátszó hálósával fedünk le. Minden egyes levélvonalhoz kiszámítjuk a fertőzött területek átlagát és a standard deviációt.

Az AGO-t expresszáló transzgenikus vonalak jelentősen gátolják a *Phytophthora infestans* fertőzés által okozott tüneteket a leveleken. Két vonalnak az eredményei láthatók a 4. ábrán. A tünetek csökkenése 47 és 57%, a kontrollokhoz viszonyítva (mind a nem-transzformált növényekhez, mind a vektor transzformánsokhoz viszonyítva).

4. Táblázat

A fertőzés területe^a (cm²)

<u>A vonal száma</u>	<u>3 dpi^b</u>	<u>4 dpi</u>	<u>5 dpi</u>	<u>6 dpi</u>
Russet Burbank	1,2	2,1	4,2	7,1
17227-1 ^c	1,6	2,7	4,7	8,7

22587-3 ^d	0,4	0,8	1,1	3,0
22587-12 ^d	0,5	1,3	2,3	3,7

- a A fertőzés területét öt levél átlagaként adjuk meg
- b A fertőzés utáni napok száma
- c kontroll vonal, amelyet csak a vektorral transzformáltunk
- d Glükóioxidázt expresszálo transzgenikus vonalak

Egyszikűek stabil transzformációja

Egyszikűek transzformációjához egy AGO-t tartalmazó vektort készítünk, egy intronnal, amely különösen hasznos olyan transzformált növények nagyobb gyakorisággal való előállításában, amelyek a kívánt fehérjét magas szinten expresszálják. Az EP 602 193-ban (ez megfelel Brown és munkatársai 08/181,364 USA sorozatszámú bejelentésének, amelyet referenciának tekintünk) ismertetett hsp70 intront használjuk. A pMON19477-et, amelyet az előzőekben ismertettünk, elhasítjuk, majd a 800 bp méretű BglII-BamHI fragmenst, amely tartalmazza a hsp70 intront, a pMON22515-ben levő egyetlen BglII hasítási helyre klónozzuk, így kapjuk a pMON22623-at.

A pMON22623-at azután búzasejtekbe juttatjuk be, mikrorészecske bombázással, ismert módszerek alkalmazásával [Vasil és mtsai.: Bio/Technology 11, 1153-1158 (1993)].

Amikor a transzformált növényeket megkapjuk, akkor a gomba-rezisztencia kapacitásukat, főleg a Ggt elleni kapacitásukat ismert módszerekkel meghatározzuk.

Az ebben a leírásban említett összes publikációt és szabadalmat referenciának tekintjük, ugyanúgy, mintha minden egyes publikációt vagy szabadalmat egyenként referenciának deklaráltuk volna.

Az előzőkből látható, hogy ez a szabadalmi bejelentés megfelel az előzőkben ismertetett minden elvárásnak és célnak, azokkal az előnyökkel, amelyek nyilvánvalók és a találmányban gyökereznek.

Az nyilvánvaló, hogy bizonyos tulajdonságok és szubkombinációk hasznosak, és alkalmazhatók anélkül, hogy egyéb tulajdonságokra és szubkombinációkra utalnánk. Ezeket is az igénypontok oltalmi körébe tartozónak tekintjük.

Mivel a találmánynak számos lehetséges megvalósítási módja képzelhető el, anélkül, hogy eltérnénk az oltalmi körtől, az nyilvánvaló, hogy minden, előzőkben ismertetett vagy a kísérő ábrákon bemutatott anyagot csak illusztratívnak szabad tekinteni, és nem korlátozónak.

Az alábbiakban közöljük a bejelentés szövegében említett szekvenciákat.

Szekvencialisták

1. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hosszúság: 1848 bázispár
 - (B) Típus: nukleinsav
 - (C) Száltípus: kétszálú
 - (D) Topológia: lineáris
- (ii) Molekulatípus: DNS (genomiális)

(ix) Tulajdonságok:

(A) Név/kulcs: CDS

(B) Lokalizáció: 16..1833

(xi) A szekvencia leírása: 1. számú szekvencia

2. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hosszúság: 605 aminosav

(B) Típus: aminosav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: fehérje

(xi) A szekvencia leírása: 2. számú szekvencia

3. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hosszúság: 33 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: DNS (genomiális)

(xi) A szekvencia leírása: 3. számú szekvencia

4. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hosszúság: 36 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: DNS (genomiális)

(xi) A szekvencia leírása: 4. számú szekvencia

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Rekombináns, kétszálú DNS molekula, amely az alábbi elemeket tartalmazza operatív sorrendben:

- a) egy promoter, amely működésével növényi sejtekben RNS szekvencia működését idézi elő;
- b) egy struktúrális kódoló szekvencia, amely AGO termelését kódolja; és
- c) egy 3' nem-transzlálódó régió, amely növényi sejtekben működve poliadenilát nukleotidoknak a hozzáadását okozza az RNS szekvencia 3' végéhez.

2. Az 1. igénypont szerinti DNS molekula, amelyben az említett struktúrális DNS szekvencia az 1. számú szekvencia szerinti szekvencia.

3. Az 1. igénypont szerinti DNS molekula, amelyben az említett promotert az FMV35S és a CaMV35S promoterek közül választjuk.

4. Az 1. igénypont szerinti DNS molekula, amelyben az említett promotert egy patogén fertőzés indukálja.

5. Eljárás genetikailag transzformált, betegségekkel szemben ellenálló növények előállítására, azzal jellemezve, hogy az alábbi lépéseket alkalmazzuk:

- a) Egy növényi sejt genomjába egy rekombináns, kétszálú DNS molekulát építünk be, amely a következő elemeket tartalmazza:

(i) egy promoter, amely működésével növényi sejtekben RNS szekvencia működését idézi elő;

(ii) egy struktúrális kódoló szekvencia, amely AGO termelését kódolja; és

(iii) egy 3' nem-transzslálódó régió, amely növényi sejtekben működve poliadenilát nukleotidoknak a hozzáadását okozza az RNS szekvencia 3' végéhez;

b) Transzformált növényi sejtek előállítása; és

c) a transzformált növényi sejtekből genetikailag transzformált növényeket állítunk elő, amelyek az AGO-t olyan mennyiségben expresszálják, amely hatékonyan csökkenti az egy bakteriális vagy gomba patogén által okozott kárt.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett kódoló szekvencia az 1. számú szekvencia.

7. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett promotert az FMV35S és a CaMV35S promoterek közül választjuk.

8. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett promotert patogén fertőzés indukálja.

9. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett növény burgonya- vagy búzanövény.

10. Egy genetikailag transzformált, betegségeknek ellenálló növény, amely egy rekombináns, kétszálú DNS molekulát tartalmaz, amely az alábbi elemeket tartalmazza operatív sorrendben:

- a) egy promoter, amely működésével növényi sejtekben RNS szekvencia működését idézi elő;
- b) egy struktúrális kódoló szekvencia, amely AGO termelését kódolja; és
- c) egy 3' nem-transzlálódó régió, amely növényi sejtekben működve poliadenilát nukleotidoknak a hozzáadását okozza az RNS szekvencia 3' végéhez.

11. A 10. igénypont szerinti növény, amelyben az említett promotert az FMV35S és a CaMV35S promoterek közül választjuk.

12. A 10. igénypont szerinti növény, amelyben az említett promotert patogén fertőzés indukálja.

13. A 10. igénypont szerinti növény, amelyben az említett struktúrális kódoló szekvencia az 1. számú szekvencia.

14. A 10. igénypont szerinti növény, amely vagy burgonya- vagy dohánynövény.

A meghatalmazott

ifj. Szentpéteri Ádám

szabadalmi ügyvivő

az S.B.G. & K. Nemzetközi

Szabadalmi Iroda vezetője

1076. Budapest, Andrássy út 113

Telefon 34-24-950, Fax 34-24-323

33 old.

5 rajz

38 old.

[Handwritten signature]



KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

TCTAGAAGAT CTATC ATG CAG ACT CTC CTT GTG AGC TCG CTT GTG GTC TCC	51
Met Gln Thr Leu Leu Val Ser Ser Leu Val Val Ser	
1 5 10	
AGC GCT GCG GCC CTG CCA CAC TAC ATC AGG AGC AAT GGC ATT GAA GCC	99
Leu Ala Ala Ala Leu Pro His Tyr Ile Arg Ser Asn Gly Ile Glu Ala	
15 20 25	
AGC CTC CTG ACT GAT CCC AAG GAT GTC TCC GGC CGC ACG GTC GAC TAC	147
Ser Leu Leu Thr Asp Pro Lys Asp Val Ser Gly Arg Thr Val Asp Tyr	
30 35 40	
ATC ATC GCT GGT GGA GGT CTG ACT GGA CTC ACC ACC GCT GCT CGT CTG	195
Ile Ile Ala Gly Gly Gly Leu Thr Gly Leu Thr Thr Ala Ala Arg Leu	
45 50 55 60	
ACG GAG AAC CCC AAC ATC AGT GTG CTC GTC ATC GAA AGT GGC TCC TAC	243
Thr Glu Asn Pro Asn Ile Ser Val Leu Val Ile Glu Ser Gly Ser Tyr	
65 70 75	
GAG TCG GAC AGA GGT CCT ATC ATT GAG GAC CTG AAC GCC TAC GGC GAC	291
Glu Ser Asp Arg Gly Pro Ile Ile Glu Asp Leu Asn Ala Tyr Gly Asp	
80 85 90	
ATC TTT GGC AGC AGT GTA GAC CAC GCC TAC GAG ACC GTG GAG CTC GCT	339
Ile Phe Gly Ser Ser Val Asp His Ala Tyr Glu Thr Val Glu Leu Ala	
95 100 105	
ACC AAC AAT CAA ACC GCG CTG ATC CGC TCC GGA AAT GGT CTC GGT GGC	387
Thr Asn Asn Gln Thr Ala Leu Ile Arg Ser Gly Asn Gly Leu Gly Gly	
110 115 120	
TCT ACT CTA GTG AAT GGT GGC ACC TGG ACT CGC CCC CAC AAG GCA CAG	435
Ser Thr Leu Val Asn Gly Gly Thr Trp Thr Arg Pro His Lys Ala Gln	
125 130 135 140	
GTT GAC TCT TGG GAG ACT GTC TTT GGA AAT GAG GGC TGG AAC TGG GAC	483
Val Asp Ser Trp Glu Thr Val Phe Gly Asn Glu Gly Trp Asn Trp Asp	
145 150 155	
AAT GTG GCC GCC TAC TCC CTC CAG GCT GAG CGT GCT CGC GCA CCA AAT	531
Asn Val Ala Ala Tyr Ser Leu Gln Ala Glu Arg Ala Arg Ala Pro Asn	
160 165 170	
GCC AAA CAG ATC GCT GCT GGC CAC TAC TTC AAC GCA TCC TGC CAT GGT	579
Ala Lys Gln Ile Ala Ala Gly His Tyr Phe Asn Ala Ser Cys His Gly	
175 180 185	
GTT AAT GGT ACT GTC CAT GCC GGA CCC CGC GAC ACC GGC GAT GAC TAT	627
Val Asn Gly Thr Val His Ala Gly Pro Arg Asp Thr Gly Asp Asp Tyr	
190 195 200	
TCT CCC ATC GTC AAG GCT CTC ATG AGC GCT GTC GAA GAC CGG GGC GTT	675
Ser Pro Ile Val Lys Ala Leu Met Ser Ala Val Glu Asp Arg Gly Val	
205 210 215 220	
CCC ACC AAG AAA GAC TTC GGA TGC GGT GAC CCC CAT GGT GTG TCC ATG	723
Pro Thr Lys Lys Asp Phe Gly Cys Gly Asp Pro His Gly Val Ser Met	
225 230 235	
TTC CCC AAC ACC TTG CAC GAA GAC CAA GTG CGC TCC GAT GCC GCT CGC	771
Phe Pro Asn Thr Leu His Glu Asp Gln Val Arg Ser Asp Ala Ala Arg	
240 245 250	

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

18003

2/5

GAA TGG CTA CTT CCC AAC TAC CAA CGT CCC AAC CTG CAA GTC CTG ACC Glu Trp Leu Leu Pro Asn Tyr Gln Arg Pro Asn Leu Gln Val Leu Thr 255 260 265	819
GGA CAG TAT GTT GGT AAG GTG CTC CTT AGC CAG AAC GGC ACC ACC CCT Gly Gln Tyr Val Gly Lys Val Leu Leu Ser Gln Asn Gly Thr Thr Pro 270 275 280	867
CGT GCC GTT GGC GTG GAA TTC GGC ACC CAC AAG GGC AAC ACC CAC AAC Arg Ala Val Gly Val Glu Phe Gly Thr His Lys Gly Asn Thr His Asn 285 290 295 300	915
GTT TAC GCT AAG CAC GAG GTC CTC CTG GCC GCG GGC TCC GCT GTC TCT Val Tyr Ala Lys His Glu Val Leu Leu Ala Ala Gly Ser Ala Val Ser 305 310 315	963
CCC ACA ATC CTC GAA TAT TCC GGT ATC GGA ATG AAG TCC ATC CTG GAG Pro Thr Ile Leu Glu Tyr Ser Gly Ile Gly Met Lys Ser Ile Leu Glu 320 325 330	1011
CCC CTT GGT ATC GAC ACC GTC GTT GAC CTG CCC GTC GGC TTG AAC CTG Pro Leu Gly Ile Asp Thr Val Val Asp Leu Pro Val Gly Leu Asn Leu 335 340 345	1059
CAG GAC CAG ACC ACC GCT ACC GTC CGC TCC CGC ATC ACC TCT GCT GGT Gln Asp Gln Thr Thr Ala Thr Val Arg Ser Arg Ile Thr Ser Ala Gly 350 355 360	1107
GCA GGA CAG GGA CAG GCC GCT TGG TTC GCC ACC TTC AAC GAG ACC TTT Ala Gly Gln Gly Gln Ala Ala Trp Phe Ala Thr Phe Asn Glu Thr Phe 365 370 375 380	1155
GGT GAC TAT TCC GAA AAG GCA CAC GAG CTG CTC AAC ACC AAG CTG GAG Gly Asp Tyr Ser Glu Lys Ala His Glu Leu Leu Asn Thr Lys Leu Glu 385 390 395	1203
CAG TGG GCC GAA GAG GCC GTC GCC CGT GGC GGA TTC CAC AAC ACC ACC Gln Trp Ala Glu Glu Ala Val Ala Arg Gly Gly Phe His Asn Thr Thr 400 405 410	1251
GCC TTG CTC ATC CAG TAC GAG AAC TAC CGC GAC TGG ATT GTC AAC CAC Ala Leu Leu Ile Gln Tyr Glu Asn Tyr Arg Asp Trp Ile Val Asn His 415 420 425	1299
AAC GTC GCG TAC TCG GAA CTC TTC CTC GAC ACT GCC GGA GTA GCC AGC Asn Val Ala Tyr Ser Glu Leu Phe Leu Asp Thr Ala Gly Val Ala Ser 430 435 440	1347
TTC GAT GTG TGG GAC CTT CTG CCC TTC ACC CGA GGA TAC GTT CAC ATC Phe Asp Val Trp Asp Leu Leu Pro Phe Thr Arg Gly Tyr Val His Ile 445 450 455 460	1395
CTC GAC AAG GAC CCC TAC CTT CAC CAC TTC GCC TAC GAC CCT CAG TAC Leu Asp Lys Asp Pro Tyr Leu His His Phe Ala Tyr Asp Pro Gln Tyr 465 470 475	1443

P9601403

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

18003

3/5

TTC CTC AAC GAG CTG GAC CTG CTC GGT CAG GCT GCC GCT ACT CAA CTG	1491
Phe Leu Asn Glu Leu Asp Leu Leu Gly Gln Ala Ala Ala Thr Gln Leu	
480 485 490	
GCC CGC AAC ATC TCC AAC TCC GGT GCC ATG CAG ACC TAC TTC GCT GGG	1539
Ala Arg Asn Ile Ser Asn Ser Gly Ala Met Gln Thr Tyr Phe Ala Gly	
495 500 505	
GAG ACT ATC CCC GGT GAT AAC CTC GCG TAT GAT GCC GAT TTG AGC GCC	1587
Glu Thr Ile Pro Gly Asp Asn Leu Ala Tyr Asp Ala Asp Leu Ser Ala	
510 515 520	
TGG ACT GAG TAC ATC CCG TAC CAC TTC CGT CCT AAC TAC CAT GGC GTG	1635
Trp Thr Glu Tyr Ile Pro Tyr His Phe Arg Pro Asn Tyr His Gly Val	
525 530 535 540	
GGT ACT TGC TCC ATG ATG CCG AAG GAG ATG GGC GGT GTT GTT GAT AAT	1683
Gly Thr Cys Ser Met Met Pro Lys Glu Met Gly Gly Val Val Asp Asn	
545 550 555	
GCT GCC CGT GTG TAT GGT GTG CAG GGA CTG CGT GTC ATT GAT GGT TCT	1731
Ala Ala Arg Val Tyr Gly Val Gln Gly Leu Arg Val Ile Asp Gly Ser	
560 565 570	
ATT CCT CCT ACG CAA ATG TCG TCC CAT GTC ATG ACG GTG TTC TAT GCC	1779
Ile Pro Pro Thr Gln Met Ser Ser His Val Met Thr Val Phe Tyr Ala	
575 580 585	
ATG GCG CTA AAA ATT TCG GAT GCT ATC TTG GAA GAT TAT GCT TCC ATG	1827
Met Ala Leu Lys Ile Ser Asp Ala Ile Leu Glu Asp Tyr Ala Ser Met	
590 595 600	
CAG TGATAAGGAT CCGGTACC	1848
Gln	
605	

Ifj. Szentpéteri Ádám
 szabadosi ügyvivő
 az S.B.G. & K. Nemzetközi
 Szabadosi Iroda tagja
 H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
 Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323



KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

Met Gln Thr Leu Leu Val Ser Ser Leu Val Val Ser Leu Ala Ala Ala
1 5 10 15

Leu Pro His Tyr Ile Arg Ser Asn Gly Ile Glu Ala Ser Leu Leu Thr
20 25 30

Asp Pro Lys Asp Val Ser Gly Arg Thr Val Asp Tyr Ile Ile Ala Gly
35 40 45

Gly Gly Leu Thr Gly Leu Thr Thr Ala Ala Arg Leu Thr Glu Asn Pro
50 55 60

Asn Ile Ser Val Leu Val Ile Glu Ser Gly Ser Tyr Glu Ser Asp Arg
65 70 75 80

Gly Pro Ile Ile Glu Asp Leu Asn Ala Tyr Gly Asp Ile Phe Gly Ser
85 90 95

Ser Val Asp His Ala Tyr Glu Thr Val Glu Leu Ala Thr Asn Asn Gln
100 105 110

Thr Ala Leu Ile Arg Ser Gly Asn Gly Leu Gly Gly Ser Thr Leu Val
115 120 125

Asn Gly Gly Thr Trp Thr Arg Pro His Lys Ala Gln Val Asp Ser Trp
130 135 140

Glu Thr Val Phe Gly Asn Glu Gly Trp Asn Trp Asp Asn Val Ala Ala
145 150 155 160

Tyr Ser Leu Gln Ala Glu Arg Ala Arg Ala Pro Asn Ala Lys Gln Ile
165 170 175

Ala Ala Gly His Tyr Phe Asn Ala Ser Cys His Gly Val Asn Gly Thr
180 185 190

Val His Ala Gly Pro Arg Asp Thr Gly Asp Asp Tyr Ser Pro Ile Val
195 200 205

Lys Ala Leu Met Ser Ala Val Glu Asp Arg Gly Val Pro Thr Lys Lys
210 215 220

Asp Phe Gly Cys Gly Asp Pro His Gly Val Ser Met Phe Pro Asn Thr
225 230 235 240

Leu His Glu Asp Gln Val Arg Ser Asp Ala Ala Arg Glu Trp Leu Leu
245 250 255

Pro Asn Tyr Gln Arg Pro Asn Leu Gln Val Leu Thr Gly Gln Tyr Val
260 265 270

Gly Lys Val Leu Leu Ser Gln Asn Gly Thr Thr Pro Arg Ala Val Gly
275 280 285

Val Glu Phe Gly Thr His Lys Gly Asn Thr His Asn Val Tyr Ala Lys
290 295 300

His Glu Val Leu Leu Ala Ala Gly Ser Ala Val Ser Pro Thr Ile Leu
305 310 315 320

Glu Tyr Ser Gly Ile Gly Met Lys Ser Ile Leu Glu Pro Leu Gly Ile
325 330 335

Asp Thr Val Val Asp Leu Pro Val Gly Leu Asn Leu Gln Asp Gln Thr
340 345 350

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

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

3. számú szekvenciavázlat

CCATCTAGAA GATCTATCAT GCAGACTCTC CTT

33

4. számú szekvenciavázlat

TGGGGTACCG GATCCTTATC ACTGCATGGA AGCATA

36

ifj. Szentpéteri Ádám
 szabadalmi ügyvivő
 az S.B.C. & K. Nemzetközi
 Szabadalmi Iroda tagja
 H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
 Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323