PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:
2001 -3986

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7]:
C 12 N 15/82
C 12 N 15/29
C 12 N 5/10
C 12 N 5/14
C 07 K 14/415
A 01 H 1/00

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **10.05.2000**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **10.05.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/9910796**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.05.2002**
(Věstník č. 5/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/GB00/01789**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/68403**

(71) Přihlašovatel:
BIOGEMMA UK LIMITED, Cambridge, GB;

(72) Původce:
Paul Wyatt, Cambridge, GB;
Scott Roderick John, Bath, GB;
Hird Diane, Bath, GB;
Hodge Rachel, Bath, GB;

(74) Zástupce:
Smola Josef Ing., Mendlovo nám. 1a, Brno, 60300;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Tapetum-specifické promotory

(57) Anotace:

Řešení se týká sekvencí nukleové kyseliny kódující tapetum-specifické promotory pro použití v systémech s umělou samčí sterilitou u rostlin. Konkrétně těmito promotory mohou být promotor pMAC2; promotor pMAC20 nebo promotorové sekvence, které přirozeně řídí expresi kódovací sekvence podstatně homologické s kódovacími sekvencemi MAC2 nebo MAC20. Také jsou poskytnuty regulační části promotorů; rostlinné buňky a rostliny transformované promotorovými sekvencemi.

CZ 2001 - 3986 A3

06.03.02

PV2001-3986

17766

Tapetum-specifické promotory

Oblast techniky

Tento vynález se zabývá aplikací genového inženýrství na rostliny za účelem dosažení samčí sterility.

Dosavadní stav techniky

Produkce hybridů pomocí sexuální hybridizace rodičů s různým genetickým původem je důležitým postupem v moderním zemědělství. V důsledku manifestace vitality hybridů jsou potomci nadřazení rodičům v takových vlastnostech, jako je plodnost a odolnost vůči chorobám. Navíc tam, kde jsou rodiče výrazně homozygotní, výsledný potomek je geneticky velmi podobný, a proto se úroda chová stejným způsobem v takových důležitých vlastnostech, jako je doba klíčení, výška vzrůstu, náchylnost k nemocem, doba květu, doba zrání semene atd., což vysoce vylepšuje účinnost managementu úrody. Z těchto důvodů jsou hybridní semena pro farmáře atraktivní.

V přírodě se upřednostňuje samooplodnění u produkce nehybridních potomků. Proto se za účelem produkce hybridního semene bez kontaminace samooplodněným semenem používá křížení za použití různých mechanických, chemických a genetických způsobů, které zabraňují samoopylení. Toho lze dosáhnout několika různými způsoby:

a) mechanickým oddělením nebo chemickou inaktivací orgánů produkujících pyl samičího rodiče dříve než dosáhne zralosti; tato metoda se použila například u kukuřice a u rajčat;
b) použitím cytoplazmaticky podmíněných sterilních samčích (CMS) mutantních rostlin; tato metoda se použila například u řepky olejky a u slunečnice;
c) použitím recesivního jádra samčí sterilní mutantní rostliny;a
d) použitím dominantního jádra samčí sterilní rostliny upravené genetickým inženýrstvím (umělá samčí sterilita nebo také AMS), jak je popsáno například v Mariani a kol., Nature **347** 737-741 (1990) nebo v Worrall a kol., The Plant Cell **4** 759-771 (1992).

Se všemi výše uvedenými způsoby jsou praktické potíže. Mechanická samčí sterilizace je náročná na práci, drahá a náchylná na lidskou chybu, čímž vyvstává

problém kvality hybridních semen. Prakticky je to možné pouze u rostlinných druhů, kde je květ dostatečně velký, aby se dal vykleštit ručně; proto toto pro většinu obilovin není prakticky možné. Snaha obejít tuto potíž a snížit náklady vede k použití chemického vyklešťování místo mechanického. Účinnost této techniky velmi závisí na podmínkách prostředí v době postřiku gametocidem a vede k tomu, že producent semene nese každou sezónu značné riziko.

Cytoplazmaticky podmíněná samčí sterilita je velmi praktická, ale její použití je limitováno dostupností vhodné mutantní rostliny u každého konkrétního druhu. Vážným problémem může být ztráta cytoplazmatické genetické diversity, kdy všichni pěstitelé v jejich pěstitelském programu použijí stejnou cytoplazmu, jak se ukázalo v USA na kukuřici v 70. letech.

Použití recesivních jaderných sterilních samčích mutantů není praktické. Protože gen samčí sterility je recesivní, udržování samčí sterilní linie zahrnuje kontrolu 1/4 samčích rostlin ze 3/4 fertilních v samooplodněném pokolení heterozygotní rostliny. Bez úzce spojeného selektivního nebo jednoduše kontrolovatelného signálního genu je to prakticky nemožné.

Použití AMS systémů zajišťuje způsoby, jak předejít problémům spojeným s ostatními způsoby. AMS genové systémy jsou potencionálně universální, pouze jsou limitovány geneticky transformovatelnými druhy. Nezávisí na existenci mutanta, jako u CMS. Udržování samčí sterilní linie se může dosáhnout řízením dominantního genu samčí sterility navázaného na signální gen, což umožňuje výběr AMS rostlin v populaci za izolace 1/2 AMS rostlin. Pro praktické použití je tento signální gen často gen odolný herbicidům.

AMS systémy obecně využívají specifickou tkáňovou expresi, například použitím promotorů / regulačních sekvencí, které řídí expresi do jedné nebo více tkání zapojených ve vývoji samčí sterility. Například tapetum, které je specializovanou vrstvou buněk prašníků, hraje rozhodující roli v zásobování živinami vyvíjejících se mikrospor. Selhání tapeta je příčinou mnoha typů přírodní samčí sterility.

Určité tapetum-specifické geny a jejich promotory byly dříve izolovány z dvouděložných i jednoděložných rostlin. Například WO 92/11379 popisuje pA3 a pA9, které pravděpodobně představují první doposud izolované exprimované tapetum-specifické promotory. Byly také popsány geny jednoděložných rostlin, které jsou podobné A9. Patří sem sekvence s kódovacími úseky, u kterých se předpokládá, že když u nich dojde k translaci, tak kódují protein s homologií A9. Například sem patří

06.03.02

kukuřičný promotor Msf14 (Wright SY, a kol., Plant J. 1993 (1): 41-9.), který je téměř identický s, a proto je pravděpodobně stejný jako, Ca444 (WO 92/13957); Osg4 z rýže (Tsuchiya a kol., Plant Mol. Biol., **26(6)**:1737-46); a LH6 a LH7 z lilie. Navíc je několik jednoděložných tapetum-specifických cDNA nebo promotorů izolovaných z jednoděložných rostlin, které nejsou podobné A9. Patří sem Ca455 a jejich promotor pA55 z kukuřice (WO 92/13957); pE1 a pT72 z rýže (WO 92/13956); a pOSG6B z rýže (Tsuchiya a kol., viz výše).

Nejsou zmínky, že by kterýkoli z těchto promotorů mohl tvořit základ účinného AMS systému u jednoděložných rostlin, za použití výhodného AMS genu sterility jako je PR-glukanáza. Navíc určité promotory jako je pA3 a pA9, ačkoliv jsou účinné u určitých dvouděložných roslin, jako je rajče (WO 97/38116), pokud jsou navázány pouze na PR-glukanázu, produkují nízký výskyt kompletní samčí sterility u jiných dvouděložných rostlin jako je tabák (Worrall *a kol.*, *The Plant Cell*, **4**:759-771 (1992)). V poslední době jsme identifikovali další promotory, které jsou více účinné při vytváření samčích sterilních jedno- a dvouděložných rostlin za použití výhodného genu sterility jako je PR-glukanáza, než ostatní dříve popsané promotory.

Podstata vynálezu

V prvním aspektu tento vynález poskytuje rekombinantní nebo izolovanou molekulu nukleové kyseliny obsahující nebo sestávající z promotoru, který je:

i) sekvencí pMAC2 promotoru, jak je to vyobrazeno na obr. 7;

ii) sekvencí pMAC20 promotoru, jak je to vyobrazeno na obr. 12;

iii) promotorem řídícím expresi kódovací sekvence, který je podstatně homologický s těmi na obr. 3 nebo obr. 6; nebo

iv) sekvence schopná hybridizace za přísně řízených podmínek na kterékoli z i), ii) nebo iii) sekvencí.

Takové promotory jsou tapetum-specifické. To v kontextu tohoto vynálezu znamená, že tyto promotory primárně řídí expresi do tapeta.

V kontextu tohoto vynálezu termín „podstatně homologický" znamená, že zmíněná sekvence má větší stupeň homologie s kteroukoli sekvencí zde popsanou, než se sekvencemi nukleové kyseliny dosavadního stavu techniky.

Pokud porovnáme sekvence nukleové kyseliny pro účely určení stupně homologie, lze použít programy jako je BESTFIT a GAP (od Wisconsin Package™,

06.03.02

Genetics Computer Group (GCG) Madison, Wisc. USA). Například BESTFIT porovnává dvě sekvence a vytváří optimální uspořádání nejpodobnějších segmentů za použití algoritmu od Smith and Waterman (Advances in Applied Mathematics **2**: 482-489, 1981). GAP umožňuje uspořádání sekvencí po celé jejich délce a vyhledává optimální uspořádání vkládáním volných míst do kterékoli vhodné sekvence za použití algoritmu od Needleman a Wunsch (J. Mol. Biol. **48**: 443-453, 1970). V kontextu tohoto vynálezu při diskutování homologie sekvencí nukleové kyseliny se porovnává uspořádání sekvence po celé její délce.

Výhodně mají sekvence s podstatnou homologií alespoň 50% sekvenční homologii, výhodněji alespoň 75% sekvenční homologii a nejvýhodněji alespoň 90% nebo 95% sekvenční homologii se zmíněnými sekvencemi. V některých případech může být sekvenční homologie 99% nebo více.

Odborník v oboru ocení podstatnou věc, že kterákoli sekvence funguje jako promotor a bude řídit expresi primárně do tapeta.

V kontextu tohoto vynálezu vhodné „přísně řízené podmínky" jsou definovány tak, jak jsou uvedené v Plant Genetic Transformation a Gene Expression: A laboratory manual, Ed. Draper, J. a kol., 1988, Blackwell Scientific Publications, str.252-255, modifikované jako: prehybridizace, hybridizace a praní při 55-65 °C, bez finálního praní (s 0,5X SSC, 0,1% SDS).

Navíc je možné odvodit základní části regulačního enzymu od zde poskytnutých promotorů. Proto tyto části promotorové sekvence, které jsou zodpovědné jak za jejich funkci jako promotor, tak, což je důležitější, za jejich tapetum-specificitu, mohou být izolovány a začleněny do molekul nukleové kyseliny, která ačkoliv nepatří do definicí (i) až (iv) uvedených výše, přesto funguje ve stejném smyslu.

Proto, v druhém aspektu, tento vynález poskytuje rekombinantní nebo izolovanou molekulu nukleové kyseliny, obsahující nebo sestávající z jedné nebo více regulačních částí odvozených od kterékoli ze sekvencí (i) až (iv) schopných řídit expresi v tapetum-specifickém smyslu.

Navíc předpokládaný pMac2 protein vlastní signální peptid, který vybírá protein pro sekreci v endoplazmatickém retikulu (viz příklad 5), což zabraňuje přístupu MAC2 k ribozomům tapetálních buněk. Odstranění signálního peptidu umožňuje akumulaci MAC2 proteinu v cytosolu a inaktivuje ribozomy, které způsobují smrt buněk. Proto MAC2 protein, kterému chybí signální peptid, může být použit jako ablátor buněk. Proto v dalším aspektu, tento vynález poskytuje rekombinantní nebo izolova-

nou molekulu nukleové kyseliny kódující MAC2 protein bez jeho přirozeného signálního peptidu.

Taková nukleová kyselina lze obdržet prostředky PCR rozšíření sekvence, viz obr. 3, za použití vhodných primerů o sekvenci:

5' CCCATGGCCTCCACCGCCTATCC 3'

5' GCCGCGGTAATTACCAGTATCTACTTCC 3'

nebo sekvence, která takto hybridizuje za přísně řízených podmínek. Takové primery tvoří další aspekt tohoto vynálezu.

Je vhodné, je-li molekulou nukleové kyseliny ve výše uvedených aspektech tohoto vynálezu molekula DNA.

Tapetum specifické promotory tohoto vynálezu mají použití v AMS systémech. Proto se mohou použít pro řízení exprese různých DNA sekvencí sterility, které kódují RNA proteiny nebo polypeptidy, které způsobují selhání mechanismů produkujících životaschopné samčí gamety. Je výhodných několik tříd a jednotlivých příkladů sekvencí samčí sterility.

Například DNA samčí sterility může kódovat lytický enzym. Lytický enzym může způsobovat lyzi jedné nebo více biologicky důležitých molekul jako jsou makromolekuly obsahující nukleovou kyselinu, protein (nebo glykoprotein), uhlovodík a za určitých podmínek tuk.

Ribonukleáza (jako je Rnáza T1) a barnáza jsou příklady enzymů, které způsobují lyzi RNA. Glukanáza je příkladem enzymu, který způsobuje lyzi uhlovodíku. Enzym kaláza (β-(1,3)-glukanáza) je přirozeně produkována v prašnících, kde má funkci uvolňovat mladé mikrospory z ochranného obalu polyglukanu (kalóza) položeného před meiózou. Výskyt enzymové aktivity je postupně regulován tak, aby se shodoval se správným stupněm vývoje mikrospory.

Jednou výhodou použití glukanázy jako DNA samčí sterility je, že je méně náchylná k potencionálním problémům ektopické exprese. Za určitých okolních podmínek nebo na určitém stupni vývoje je možné, že transgeny budou v malých hladinách exprimovány ektopicky. Tato exprese může být způsobena aktivací genů a promotorů obklopujících transgen nebo expresí transaktivátorů, které se váží v okolí transgenu (poziční efekt). Nelze předpokládat, zda jednotlivý transgen bude ektopicky aktivovaný za daných okolních podmínek nebo za daného stupně vývoje, takže genomická sekvence obklopující každý transgen může být jedinečná. Takto to bude, dokud stávající transformační technologie budou vést k nepředvídatelné inte-

06.03.02

graci transgenu do genomu. Takové problémy nepředvídatelné exprese transgenu jsou celkem vážné u vysoce aktivních buněčně nespecifických cytotoxických transgenů jako je barnáza. Uvádělo se, že jeden barnázový protein může způsobit buněčnou smrt. Zkoumání širokého pole barnázových transformantů eliminuje většinu transformantů, u kterých se taková ektopická exprese vyskytuje. Přesto je toto zkoumání pracné a je zde vždy možnost, že podmínky způsobující ektopickou expresi se nevyskytnou před uvedením rostlinné linie na trh.

Tento problém ektopické exprese barnázy se může minimalizovat „konstitutivní" expresí inhibitoru barnázy, barstaru, tak, že je exprimován ve všech typech buněk bez ohledu na typ cílové buňky (např. tapetum prašníků). Přesto konstitutivní exprese barstaru může být nežádoucí, jelikož všechny jedlé části rostliny nyní obsahují protein barstar. Také ne všechny typy buněk mohou mít dostatečně chráněnou expresi barstaru.

Glukanáza a barnáza představují výhodná provedení lytického enzymu pro použití s molekulami nukleové kyseliny tohoto vynálezu.

Další výhodou je, že PR glukanázový systém je více „přirozený", než systém barnázový. Předčasná exprese PR-glukanázy napodobuje nebo fenokopíruje přirozený samčí sterilní čirok a mutanty petúnií (Worrall a kol., (1992) Plant Cell. 4, 759-771).

DNA samčí sterility nemusí kódovat lytický enzym. Další příklady DNA samčí sterility kódují enzymy, které katalyzují syntézu fytohormonů, jako je izopentyl transferáza, která je zapojena do syntézy cytokininu a jednoho nebo více enzymů zapojených do syntézy auxinu. Další příklad DNA samčí sterility kóduje RNA enzym (známý jako ribozym) schopný vysoce specifického štěpení dané cílové sekvence (Haseloff and Gerlach, Nature **334** 585-591 (1988)).

Jiné DNA samčí sterility obsahují antimediátorové sekvence. Zavedení kódovacího úseku genu v obráceném směru oproti směru, který lze najít v přírodě, může vést k poklesu regulace genu a tudíž k produkci nižšího množství, nebo k vůbec žádnému produktu genu. RNA přepsaná z antimediátorové DNA je schopná se navázat na mediátorovou RNA, která má sekvenci, kterou lze normálně najít v buňce, čímž ruší její funkci.

Pro antimediátorovou DNA není rozhodující, jestli je přepsaná pouze když se tvoří transkript o přirozeném směru. Antimediátorová RNA se bude obyčejně vázat

jen pokud je přítomen antikódující komplementární řetězec, a tak bude mít toxický účinek jenom pokud se přepíše antikódující řetězec.

V dalším aspektu tento vynález poskytuje sadu primerů vhodných pro PCR rozšíření úseku promotoru MAC2 genu kukuřice o následující sekvenci:

3' GGTCGACTTGGAATAATTTAAGTTGT 5'

3' GATCACCATGGTACTACTCCAC 5'

nebo o sekvenci, která takto hybridizuje za přísně řízených podmínek.

Použité primery lze použít pro rozšíření promotoru z kukuřičné genomické DNA. Odborník to ocení přesto, že ty samé primery mohou být použity pro PCR rozšíření z jiných jednoděložných rostlin jako je rýže, pšenice a lilie.

DNA podle tohoto vynálezu může být ve formě vektoru. Takové vektory tvoří další aspekt tohoto vynálezu. Vektor může být například plazmid, kosmid nebo fág. Vektory často obsahují jeden nebo více selektivních signálních genů, které umožňují selekci transfektovaných nebo transformovaných buněk a umožňují selekci buněk přechovávajících vektory se zabudovanou heterologní DNA. Mezi příklady takového signálního genu patří antibioticky rezistentní geny (EP-A-0242246) a glukuronidázu (GUS) exprimující geny (EP-A-0344029). Exprese signálního genu je výhodně řízena druhým promotorem, který dovoluje expresi v buňkách jiných než je tapetum, proto umožňuje selekci buněk nebo tkáně obsahující signální gen v kterémkoli stupni regenerace rostliny. Výhodný druhý promotor je odvozen od genu, který kóduje 35S podjednotku viru mozaiky květáku (CaMV) obalového proteinu. Nicméně lze použít jakýkoli vhodný druhý promotor.

Klonovací vektory mohou být zavedeny do E. Coli nebo jiného vhodného hostitele, který umožňuje jejich manipulaci. Sekvence nukleové kyseliny podle tohoto vynálezu může být zavedena do buněk rostlin jakýmkoli vhodným způsobem. Proto podle dalšího aspektu tohoto vynálezu, je poskytnuta rostlinná buňka obsahující molekulu nukleové kyseliny podle tohoto vynálezu. Výhodně je tato rostlinná buňka transgenní.

Nukleová kyselina se může přetransformovat do rostlinných buněk za použití neaktivovaného Ti-plasmid vektoru a za přenosu agrobakterií způsoby běžnými v oboru, například tak, jak je popsáno v EP-A-0117618 a EP-A-0270822. Alternativně může být zavedena cizí nukleová kyselina přímo do rostlinných buněk za použití zdroje částic. Tento způsob může být výhodný např. pokud cílová rostlina je jednoděložná.

06.03.02

Celá rostlina může být regenerována z jedné transformované rostlinné buňky. Proto v dalším aspektu tento vynález poskytuje transgenní rostliny (nebo jejich části, jako rozmnožovací materiál, který také může být transgenní) obsahující sekvence nukleové kyseliny podle tohoto vynálezu. Regeneraci lze provést známými metodami. Když transformovaná rostlina kvete, lze vidět, že je samčí pohlaví sterilní tím, že není schopná produkovat životaschopný pyl. Tam, kde je pyl produkován, lze potvrdit, že není životaschopný tím, že nezpůsobí tvorbu semene u cílové rostliny.

V posledních aspektech tento vynález poskytuje:

(a) použití molekul nukleové kyseliny tohoto vynálezu při transformaci hostitelské buňky, výhodně buňky rostlinné, a nejvýhodněji buňky jednoděložné rostliny; a

(b) použití molekul nukleové kyseliny tohoto vynálezu při produkci samčí sterilní rostliny.

Výhodné znaky pro každý aspekt jsou takové, jako pro kterýkoli jiný aspekt *mutatis mutandis*.

Přehled obrázků na výkresech

Vynález teď bude popsán pomocí následujících příkladů, které by neměly být konstruovány tak, že by nějakým způsobem limitovaly rozsah tohoto vynálezu. Příklady popisují přiložené obrázky, kde:

Obr.1 - znázorňuje RT-PCR data pro Mac2. Zdroj kukuřičné RNA použitý v každé reakci je uveden pod gelem. -RT reakce jsou kontrolní reakce bez reverzní transkriptázy. +RT reakce obsahují reverzní transkriptázu. Je zaveden 1kb Ladder (Gibco BRL) jako signální gen velikosti DNA na kterékoli straně pruhů obsahujících RT-PCR produkty.

Obr.2 - znázorňuje *in situ* data pro Mac2. Části samčího květu se sondovaly pomocí značeného antikódujícího Mac2 jako kontroly (A) nebo značeného kódujícího Mac2 (B). Tapetum lze pozorovat jako silně označené (černé kruhy) jen antikódující sondou.

Obr.3 - znázorňuje sekvenci Mac2 cDNA. Předpokládaná sekvence aminových kyselin proteinu Mac2 je znázorněna pod sekvencí DNA. Primery použité pro TAIL-PCR jsou znázorněny nad sekvencí cDNA.

06.03.02

Obr.4 - znázorňuje seřazení Mac2 s typem 1-RIPy. Vstupní kódy do genové banky pro sekvence jsou: kukuřičný RIP3 (M83926), ječmenný RIP1 (M62905, M36990) a pšeničný tritin (D13795).

Obr.5 - znázorňuje RT-PCR data pro Mac20. Zdroj kukuřičné RNA pro každou reakci je dán pod gelem. -RT reakce jsou kontrolní reakce bez reverzní transkriptázy. +RT reakce obsahují reverzní transkriptázu. Je zaveden 1kb Ladder (Gibco BRL) jako signální gen velikosti DNA na kterékoli straně pruhů obsahujících RT-PCR produkty.

Obr.6 - znázorňuje sekvenci Mac20 cDNA. Předpokládaná sekvence aminových kyselin proteinu Mac20 je znázorněna pod sekvencí DNA.

Obr.7 - znázorňuje TAIL-PCR sekvenci Mac2T-3. AD1 a Mac2T3 primery použité na PCR této sekvence jsou znázorněny nad sekvencí DNA. Rozdíly nukleotidů v porovnání Mac2T-1 a jiných TAIL-PCR produktů jsou znázorněny pod sekvencí DNA ("-" = chybějící nukleotid). Sekvence aminokyselin předpokládaného Mac2 peptidu je znázorněna pod sekvencí DNA: Sekvence primerů použitých na PCR promotoru jsou znázorněny ve spodní části nad TAIL-PCR sekvencí. Dva rozdíly v sekvenci u PCR produktu v porovnání se sekvencemi TAIL-PCR jsou znázorněny nad sekvencí TAIL-PCR.

Obr.8 - je schématický diagram pMac2-GUSbin

Obr.9A - znázorňuje schématický diagram pMac2-barnázového binu. Obrázky 9B-D znázorňují úzké průřezy pMac2-barnázových prašníků tabáku, jak jsou vidět pod světelným mikroskopem. Obr.9B znázorňuje samotný pylový váček z divokého druhu rostliny; obr.9C znázorňuje jeden pylový váček rostliny nesoucí strukturu Mac2-barnázy; a obr.9D znázorňuje pohled o malém zvětšení na úsek prašníku Mac2-barnázové rostliny, u které všechny čtyři pylové váčky jsou viditelně zborcené.

Obr.10A - znázorňuje schématický diagram pMac2-PR-glukanázového binu. Obrázky 10B a 10C znázorňují fluorescenční mikrosnímek čtveřice mikrospor jak divokého, tak transformovaného tabáku, při obarvení kalózy anilinovou modří. Obr.10D a E znázorňují rastrovací elektronové mikrosnímky tabákových mikrospor/pylu jak od divoké, tak i transformované rostliny.

Obr.11 - znázorňuje A) část DNA sekvence pMac2 ukazující, kde se váží ΔMac2F a ΔMac2R primery; a B) schématický diagram pA9-ΔMac2.

Obr.12 - znázorňuje pMac20 genomickou sekvenci s předpokládanou Mac20 peptidovou sekvencí znázorněnou pod DNA sekvencí.

06.03.02

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Izolace kukuřičných cDNA představující transkripty tapetum-specifických genů exprimovaných před uvolněním mikrospor

U většiny druhů rostlin je stádium mikrosporogeneze v prašnících silně korelující s délkou květních pupenů a prašníků (Scott a kol. (1991) Plant Mol Biol. **17**, 195-207). Mikroskopická analýza prašníků kukuřice druhu A188 stanovila následující korelaci mezi délkou prašníků a vývojovou fází: 0 - 2 mm = před stádiem tetrád. 2 - 4 mm = tetrády, uvolnění mikrospor a volné mikrospory. 4 - 6 mm = volné mikrospory.

Aby se použil samčí systém sterility na základě předčasné degradace kalózy (β-(1,3)-vázaný glukan) vytvořené při meióze, je nutné izolovat promotor genu, který je vysoce exprimován během vývojové fáze, kdy kalóza obklopuje mikrosporocyty, mikrosporocyty podstupující meiózu a tetrády. Proto je nezbytně nutné, aby se tento promotor exprimoval před uvolněním mikrospor (MR). Promotor by měl také být exprimován v tapetu a/nebo v mikrosporocytech. Takové promotory jsou samozřejmě potenciálně užitečné v systémech samčí sterility, které nejsou založeny na předčasné degradaci callózy.

Následně se oddělilo a analyzovalo 100 mg prašníků, které obsahují mikrosporocyty před uvolněním mikrospor (<MR), ze samčích květů kukuřice druhu A188, a izolovalo se 13 μg celé RNA za použití Rneasy Plant Mini Kit (Qiagen) podle instrukcí výrobce. Použilo se 840 ng celé RNA pro konstrukci cDNA knihovny v Lambda gt11 za použití Capfinder PCR kit (Clonetech) podle instrukcí výrobce.

Abychom zajistili sondy pro diferenční prozkoumání této <MR cDNA knihovny, připravila se cDNA z <MR prašníku, 0 - 2 mm prašníku, A9-barnázového prašníku a RNA semenné rostliny a byly označeny DIG za použití DIG-High Prime kit (Boehringer Mannheim). Tato cDNA se použila pro zkoumání destiček z knihovny podle způsobů poskytnutých Dig User's Guide od Boehringer Mannheim. Nejdřív byla diferenčně zkoumána <MR cDNA knihovna s kukuřičnými semennými rostlinami a <MR prašníkovými sondami. 42 destiček, které potencionálně představovaly kódy speci-

06.09.02

fické pro prašník, bylo přezkoumáno oproti semenné rostlině, prašníku, a také znovu oproti A9-barnázovým prašníkovým sondám (transformace kukuřice chimérickým genem A9-barnázy (Paul a kol., *Plant Molecular Biology* **19** 611-622 (1992)), což vedlo k samčím sterilním rostlinám v důsledku ablace tapeta prašníků. Proto pokud destička představuje kód exprimovaný do tapeta prašníků, hybridizační signál by neměl být přítomen, nebo by měl být redukován. Toto druhé zkoumání ukázalo, že 26 destiček představovalo kódy přítomné v RNA fertilního prašníku, ale nepřítomné v semenné rostlině ani v barnázové RNA prašníku.

26 cDNA se zpracovalo pomocí PCR z Lambda gt11, znovu naklonovalo do pGEM-T (Promega) a určila se DNA sekvence. Tato analýza ukázala, že těchto 26 cDNA sestávalo z 8 skupin. Byly namodelovány dva primery ke každé z 8 skupin a použilo se RT-PCR pro determinaci prostorového uspořádání exprese a k ověření prostorové exprese klonů. RNA použitá v této analýze byla z <MR, A9 barnázy, 0 - 2 mm, 2 - 4 mm a 4 - 6 mm prašníků. Při tomto zkoumání se vybraly dva klony, Mac2 a Mac20, které potencionálně představují silně exprimované tapetum-specifické a/nebo mikrosporocyty-specifické geny exprimované před vypuštěním mikrospor.

i) Mac2

Tato cDNA byla representována osmkrát v 26 cDNA, což vyplývá z druhého zkoumání. RT-PCR data (obr.1) ukazují početné zastoupení Mac2 mRNA v 0 - 2 mm prašnících, také je přítomna v nižším množství ve starších prašnících (2 - 4 mm), které jsou výrazně "po uvolnění mikrospor", ale není přítomna ve starších 4 - 6 mm prašnících. Překvapivě je také Mac2 mRNA přítomna v A9-barnázových prašnících (obr.1, pruh 8), kde je tapetum ablatováno.

Byla provedena *in situ* analýza segmentovaných prašníků na základě popisu v Boehringer Mannheim Non-Radioactive In Situ Hybridisation Manual. Byly vyseknuty 15μm a 30μm segmenty pomocí kryostatu (Shandon). RNA sondy byly označeny pomocí DIG RNA značkovací sady (Boehringer Mannheim) podle instrukcí výrobce a hybridizace proběhla přes noc při 42 °C. Výsledky (obr.2) ukazují, že Mac2 mRNA je přítomná v tapetu kukuřičných prašníků a není přítomná ve stěně prašníků. Jestliže Mac2 je tapetum-specifické, zjištění, že Mac2 mRNA je také přítomná v A9-barnázových prašnících, ukazuje, že v kukuřici je exprimován Arabidopsis thaliana A9-tape-

06.03.02

tum-specifický promotor po výskytu Mac2 mRNA. Toto naznačuje, že promotor Mac2 bude exprimován dříve než promotor pA9, a proto bude nadřazený při předčasné expresi β-(1,3)-glukanázy.

DNA sekvenční analýza ukazuje, že nejdelší Mac2 cDNA předpokládaně kóduje 297 aminokyselinový protein s předpokládaným signálním peptidem předpovídaným programem Signal P (Neilson a kol., (1997) Protein engineering **10** 1,6) (obr.3). Databázové vyhledávání ukazuje, že Mac2 předpokládaný protein vykazuje nízkou homologii s typem 1-ribosom inaktivujícím proteinům (RIP) z kukuřice, pšenice a ječmene, které jsou exprimovány v semenech (obr.4). Nejlepší homologie je s Kukuřičným RIP3 se 17% identitou na proteinové úrovni (Clustal V score of 14,1). Southern analýza ukázala, že Mac2 cDNA hybridizuje ve 3 nebo 4 pásech v kukuřičné genomické DNA vyseknuté pomocí EcoRI. Hybridizace probíhala při 65 °C za použití Digoxigeninem-označené Mac2 sondy, jak je popsáno v Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes, Methods in Molecular Biology Vol.**28** (1994) Ed. Isaac PG Humana Press Inc.

(ii) Mac20

Tato cDNA byla jednou zastoupena v 26 cDNA vzniklých ze sekundárního zkoumání. RT-PCR data (obr.5) ukazují Mac2 mRNA početně zastoupenou v 0 - 2 mm prašnících, je také přítomna ve velmi sníženém množství ve starších prašnících (2 - 4 mm), které jsou do velké míry "po uvolnění mikrospor", ale chybí ve starších 4 - 6 mm prašnících. Slabý signál je také přítomen v A9-barnázových prašnících (obr.5, pruh 8), což opět indikuje, že Mac20 mRNA může být exprimována před aktivitou pA9 v kukuřici.

Sekvencování ukazuje, že Mac20 cDNA předpokládaně kóduje 103 aminokyselinový protein s předpokládaným signálním peptidem předpokládaným programem Signal P (Neilson a kol., (1997) Protein engineering **10** 1,6) (obr.6). Mac20 DNA sekvence a domnělý protein Mac20 nevykazují žádné výrazné zmínky v DNA a proteinových databázích. Southern analýza ukázala, že Mac20 cDNA hybridizuje v asi 5 pásmech v kukuřici BamHI a pomocí EcoRI-vyseknuté genomické DNA a 3 pásmy v HindIII-vyseknuté pšeničné genomické DNA. Hybridizace probíhala při 65 °C za použití Digoxigeninem-označené sondy tak, jak je popsáno v Protocols for

06.03.02

Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes, Methods in Molecular Biology Vol. **28** (1994) Ed. Isaac PG Humana Press Inc.

Příklad 2

Izolace a charakterizace úseku promotoru kukuřičného genu Mac2

TAIL-PCR se použilo pro izolaci sekvence 5' z genu Mac2 z kukuřičné genomické DNA. TAIL-PCR se provedlo metodou podle Liu a kol., Plant Journal **8** 457-463 (1995). Byly sestaveny tři Mac2 specifické primery:

Mac2t1 (5'-AGT CAT CAA TGG CTA TGG CCA G-3'), která se váže na pozicích 343-322 bp Mac2 cDNA (obr. 3); Mac2t2 (5'-CGT ATC TTT GCA TGA CCT CTT GG-3'), která se váže na 232-210 bp (obr. 3) a Mac2t3 (5'-GTG GAG GTG CAA AAC AGC AGG T-3'), která se váže na 103-82 bp (obr. 3). Tyto primery byly individuálně použity s degenerativním primerem AD1 (5'-NTCGASTWTSGWGTT-3') ve třech kolech PCR začínající kombinací AD1 s většinou 3' Mac2 primeru a končící AD1 s většinou 5' Mac2 primeru.

1,3 kb TAIL-PCR produkty byly klonovány do pGEM-T. 2 klony, Mac2T-1 a Mac2T-3, byly kompletně sekvenovány a 6 klonů Mac2T-2/4/6/7/8/9 bylo částečně sekvenováno. Obdržené konvenční sekvence obsahují nejistoty na pěti pozicích: 86bp (T nebo C), 347bp (zbytky 7 nebo 8 A), 555bp (zbytky 8 nebo 9 A), 665bp (G nebo A) a na 754bp (G nebo A) (obr.7). Z této sekvence byly sestaveny dva primery (obr.7) pomocí PCR z 1,2kb úseku předpokládaného promotoru z kukuřičné genomické DNA:

3' GGTCGACTTGGAATAATTTAAGTTGT 5' = nový Mac2P5'

3' GATCACCATGGTACTACTCCAC 5' = mAC2p3'N

5' primer zavedl SaI lokalizaci a 3' primer NcoI lokalizaci (okolo iniciačního "ATG" kodónu předpokládaného Mac2 proteinu) pro usnadnění následného klonování. PCR produkty byly klonovány do pGEM-T (Promega) a sekvenovány. Klon, který obsahuje sekvenci nejvíce podobnou konvenční TAIL-PCR sekvenci, byl pojmenován pMac2Prom. Tato sekvence byla identická s TAIL-PCR konvenční sekvencí, kromě záměny T za C na pozici 762bp a zrušení T zbytku na pozici 893bp (obr.7).

08.03.02

Pro charakterizaci prostorové a temporální exprese vzorce řízené 1,2kb Mac2 promotorovým úsekem (pMac2) byl tento úsek spojen s referentním genem β-glukuronidázou (Jefferson a kol., EMBO J **6** 3901 (1987)) a transformován do tabáku a kukuřice. Fragment SalI pMac2 se vyseknul z pMac2Prom a klonoval do SalI lokalizace v pBluescript KS+ (Stratagen), tvořící pKSMac2Prom, takže NcoI lokalizace v pMac2 byla sousedící s lokalizací XhoI v pBluescript KS+. Fragment NcoI-XhoI obsahující GUS intron+CaMV polyadenylační sekvenci, byl klonován z pDH68 (WO 99/13089) mezi NcoI a XhoI lokalizacemi v pKSMac2Prom tvořící pMac2-GUS. Úsek pMac2-GUS-CaMVpolyA byl poté vyseknut z pMac2-GUS jako HindIII, XhoI fragment a klonován mezi lokalizace HindIII, SalI binárního vektoru pBin19 (Bevan MW, (1984) Nucleic Acid Research 12, 8711-8721) tvořící pMac2-GUS bin (obr.8).

pMac2-GUSbin byl transferován do agrobakteriálního kmene LBA4404 a transformován do N. tabacum za použití agrobakteriální techniky na základě listů. Transformované rostliny N. tabacum vykazují GUS expresi v tapetu prašníků. Exprese začíná před uvolněním mikrospor.

pMac2-GUS byl také transformován do kukuřice za použití standardního způsobu bombardování částicemi. Transformované kukuřičné rostliny vykazují GUS expresi v prašnících o délce 0 - 2 mm s lokalizací exprese do tapeta. Exprese pMac2-GUS v tapetu kukuřice je mnohem silnější než později pozorovaná exprese u pA3-GUS, pA6-GUS a pA9-GUS transformované kukuřice. Toto ukazuje, že pMac2 je nadřazený v kukuřici před *A.thaliana* promotory A3 (WO 92/1179), A9 (WO 92/1179) a A6 (WO 93/02197) pro aplikace, které vyžadují výraznou expresi do tapeta.

Příklad 3

Stavba chimérického pMac2-barnázového genu a jeho exprese v transgenních rostlinách

Pro demonstraci prospěšnosti pMac2 promotoru v produkci samčích sterilních rostlin a pro další charakterizaci prostorové a temporální pMac2 exprese vzorce, byl pMac2 spojen s ribonukleázbarnázou (Hartley, RW J.Mol.Biol (1988) **202**, 913-915). Fragment SalI, NcoI 1224bp Mac2 promotoru byl vyseknut z pMac2Prom a klonován mezi lokalizace SalI a NcoI v pWP127 (Paul a kol., Plant Molecular Biology **19** 611-622 (1992)). Výsledný plasmid (pMac2-barnázy) byl stráven SstI a EcoRV a pMac2-

06.03.02

barnáza-CaMVpolyA chimérický gen byl transferován do SstI, SmaI lokalizací binárního vektoru pBin19 za tvorby pMac2-barnázového binu (obr.9).

pMac2-barnázový bin byl transferován do agrobakteriálního kmene LBA4404 a transformován do *N. tabacum*. Transformované rostliny *N. tabacum* jsou fenotypicky divokým druhem, kromě samčí sterility způsobené ablací tapeta. Obr.9 ukazuje výsledky mikroskopické analýzy prašníků divokého druhu transformovaných rostlin tabáku. U divokého druhu (obr.9B) je vidět, že pylové váčky mají dobře vyvinuté tapetum (obr. 9B, T) a mikrospory ve stádiu tetrád (obr.9B, M). Přesto u transformovaných rostlin je pylový váček zborcený a chybí mu jednoznačně ohraničené tapetum a mikrospory (obr.9C). Tato rostlina byla samčí sterilní, ale samičí fertilní.

pMac2-barnáza byla také transformována do kukuřice za použití standardní metody bombardování částicemi. Všech 8 transformovaných rostlin byly transformované rostliny kukuřice a byly fenotypicky divoké druhy, kromě samčí sterility způsobené ablací tapeta.

Příklad 4

Stavba chimérického pMac2-PR-glukanázového genu a jeho exprese v transgenních rostlinách

Za účelem vytvoření samčích sterilních rostlin předčasným rozpuštěním kalózy byl pMac2 spojen s PR glukanázovým genem (Worrall a kol., (1992) Plant Cell. **4**, 759-771). Fragment SalI, NcoI 1224bp Mac2 promotoru byl vyseknut z pMac2Prom a klonován mezi lokalizace SalI a NcoI v pDW80PR (Worrall a kol., (1992) Plant Cell. **4**, 759-771). Výsledný plasmid (pMac2-PRG) byl stráven SstI a EcoRV a pMac2-PR Glukanáza-CaMVpolyA chimérický gen byl transferován do SstI, SmaI- štěpu pBin19 tvořící pMac2-PRG bin (obr.10).

pMac2-PRG bin byl transferován do agrobakteriálního kmene LBA4404 a transformován do *N. tabacum*. Transformované *N. tabacum* rostliny jsou fenotypicky divoké druhy, kromě jejich samčí sterility. Výsledky mikroskopického zkoumání prašníků z transformovaných rostlin jsou ukázány na obr.10. U divokého druhu (obr.10B) jsou tetrády prašníků separovány a mají obvyklou morfologii. Každá tetráda má vysoce fluoreskující kalózové přepážky a kalózové vnější stěny. Naproti tomu tetrády extrudované z prašníků transformovaných rostlin jsou nahromaděné pospolu, jak lze

06.03.02

usoudit z fluorescence indukované anilinovou modří. Tetrádám chybí jak kallózové přepážky, tak i vnější stěny (obr.10C).

Rastrovací elektronové mikrosnímky tabákových mikrospor/pylu jak od divokého druhu, tak od pMAC2-PR glukanázových rostlin jsou ukázané na obrázcích 10D a E, v tomto pořadí. U divokého druhu lze vidět, že má dobře vyvinutá pylová zrníčka s uniformní morfologií, každé zrníčko je separované a kulaté s hladkou pylovou stěnou s častými malými dírkami. Naproti tomu mikrospory transformovaných rostlin jsou velmi nepravidelné a zdá se, že jsou spojené dohromady v malých shlucích.

Silně snížené hladiny kalózy obklopující buňky procházející meiózou a obklopující tetrády, vedou k následné smrti mikrospor a k samčí sterilitě. Častost naprosté samčí sterility byla mnohem větší, než pozorovaná za použití pA9-PR glukanázy (Worrall a kol., viz výše). Cytologicky se fenotyp spojených tetrád podobá fenotypu pA9-PR glukanázových v rajčeti. U takovýchto druhů tvoří pA9-PR glukanáza vysokou častost naprosté sterility.

pMac2-PRG byl transformován v kukuřici za použití standardního způsobu bombardování částicemi. Transformované rostliny kukuřice jsou fenotypicky divoké druhy, kromě samčí sterility způsobené sníženou hladinou callózy v prašnících před vypuštěním mikrospor.

Příklad 5

Exprese modifikovaného Mac2 proteinu v transgenních rostlinách

Předpokládaný Mac2 protein vykazuje homologii s typem 1-RIP (příklad 1). Přítomnost signálního peptidu v Mac2 proteinu jej zaměřuje k sekreci do endoplasmatického retikula, čímž se předchází přístupu Mac2 do ribozomů tapetálních buněk. Oddělení tohoto signálního peptidu dovoluje Mac2 proteinu se akumulovat v cytosolu a inaktivaci ribozomů způsobujících smrt buněk. Proto Mac2 protein bez signálního peptidu (ΔMac2) je obecně užitečný jako buněčný ablátor a poskytuje rostlinnou odvozenou alternativu k bakteriálnímu barnázovému proteinu. Pro demonstraci užitečnosti tohoto modifikovaného Mac2 proteinu se používá tvorby samčích sterilních rostlin pomocí ablace tapetálních buněk. Tapetum-specifické promotory, které by mohly být použitelné, obsahují samotný pMac2 nebo promotory izolované z

06.03.02

Arabidopsis jako je pA9 (Paul a kol., Plant Molecular Biology **19** 611-622 (1992)). Spojení pA9-ΔMac2 je postaveno následovně. Následující primery byly použity pro PCR Mac2 úseky kódující Mac2 protein, kterému chybí signální peptid (obr.11A):

5' CCCATGGCCTCCACCGCCTATCC 3' ΔMac2F a

5' GCCGCGGTAATTACCAGTATCTACTTCC 3' ΔMac2R

843bp produkt PCR byl stráven NcoI a SstII a klonován mezi NcoI a SstII lokalizacemi p WP112 (WO 92/11379) tvořící pA9-ΔMac2 (obr.11b). pA9-ΔMac2-CaMV polyA úsek v pA9-ΔMac2 byl vyseknut jako HindIII, EcoRV fragment a klonován mezi HindIII a SmaI lokalizace v pBin19 tvořící pA9-ΔMac2bin.

PA9-ΔMac2bin byl transferován do agrobakteriálního kmene LBA4404 a transformován do *N. tabacum*. Transformované *N. tabacum* rostliny jsou fenotypicky divoké druhy, kromě jejich samčí sterility způsobené ablací tapeta.

PA9-ΔMac2 byl také transformován v kukuřici za použití standardního způsobu bombardování částicemi. Transformované kukuřičné rostliny jsou fenotypicky divoké druhy, kromě jejich samčí sterility způsobené ablací tapeta.

Příklad 6

Izolace a charakterizace promotorového úseku kukuřičného genu Mac20

Pro izolaci promotorového úseku genu Mac20 se použila inverzní PCR (IPCR). Kukuřičná genomická DNA se strávila pomocí BalI, která se v Mac20 štěpí a recirkuluje s T4 DNA ligázou. Divergentní primerové páry, které se váží uvnitř Mac20, byly použity pro obdržení Mac20 fragmentu pomocí PCR. Sekvencování (obr. 12) ukázalo, že tento fragment byl v oblasti překryvu z 96 % identický s Mac20. Analýza RT-PCR s primery specifickými pro kódovací úseky IPCR Mac20 genu ukázala, že IPCR Mac20 gen má stejnou temporální a prostorovou expresi vzorce jako gen Mac2. Potom lze obdržet delší promotorový úsek z kukuřičné genomické DNA pomocí TAIL PCR v podstatě tak, jak je popsáno v příkladu 2.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Rekombinantní nebo izolovaná molekula nukleové kyseliny obsahující nebo sestávající z promotoru, který je:

(i) sekvencí pMAC2 promotoru, jak je znázorněna na obrázku 7;

(ii) sekvencí pMAC20 promotoru, jak je znázorněna na obrázku 12;

(iii) promotor řídící expresi kódující sekvence, která je v podstatě homologická se sekvencemi znázorněnými na obrázku 3 nebo obrázku 6; nebo

(iv) sekvence schopná hybridizace za přísně řízených podmínek na kteroukoli z (i), (ii) nebo (iii) sekvencí.

2. Rekombinantní nebo izolovaná molekula nukleové kyseliny obsahující nebo sestávající z jedné nebo z více regulačních částí odvozených z kterékoli ze sekvencí (i) až (iv) schopných řízení exprese tapetum-specifickým způsobem.

3. Rekombinantní nebo izolovaná molekula nukleové kyseliny kódující MAC2 protein, kterému chybí jeho přirozený signální peptid.

4. Dvojice primerů o sekvenci:

5' CCCATGGCCTCCACCGCCTATCC 3'

5' GCCGCGGTAATTACCAGTATCTACTTCC 3'

nebo sekvence, která na tyto sekvence hybridizuje za přísně řízených podmínek.

5. Molekula nukleové kyseliny podle kteréhokoli z nároků 1 až 3, která je molekulou DNA.

6. Molekula nukleové kyseliny podle nároku 1, 2 nebo 5, která dále obsahuje nukleovou kyselinu, jejíž následná exprese má za následek samčí sterilitu rostliny.

7. Molekula nukleové kyseliny podle nároku 6, kde nukleová kyselina samčí sterility kóduje lytický enzym.

8. Molekula nukleové kyseliny podle nároku 7, kde lytický enzym je glukanáza nebo barnáza.

9. Nukleová kyselina podle nároku 8, kde glukanáza je PR-glukanáza.

10. Dvojice primerů o sekvenci:
3' GGTCGACTTGGAATAATTTAAGTTGT 5'
3' GATCACCATGGTACTACTCCAC 5'
nebo o sekvenci, která na tyto sekvence hybridizuje za přísně řízených podmínek.

11. Vektor obsahující molekulu nukleové kyseliny podle kteréhokoli z nároků 1 až 3 nebo nároků 5 až 9.

12. Hostitelská buňka transformovaná pomocí vektroru podle nároku 11.

13. Hostitelská buňka podle nároku 12, která je buňkou rostlinnou.

14. Hostitelská buňka podle nároku 13, která je buňkou jednoděložné rostliny.

15. Rostlina obsahující jednu nebo více rostlinných buněk podle nároku 13 nebo nároku 14.

16. Použití molekuly nukleové kyseliny podle kteréhokoli z nároků 1 až 9 při transformaci hostitelské buňky, výhodně rostlinné buňky a výhodněji buňky jednoděložné rostliny.

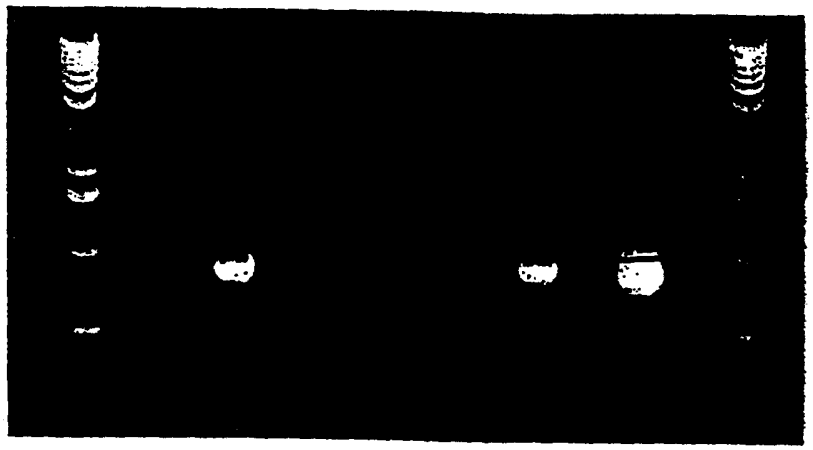
17. Použití molekuly nukleové kyseliny podle kteréhokoli z nároků 1 až 9 při produkci samčí sterilní rostliny.

18. Použití podle nároku 17, kde samčí sterilní rostlina je jednoděložná, jako je kukuřice, rýže, lilie nebo pšenice.

06.03.02
PV2001-3586
17766

RT-PCR analýza Mac2

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



1: 0-2mm prašník -RT
2: 0-2mm prašník +RT
3: 2-4mm prašník -RT
4: 2-4mm prašník +RT
5: 4-6mm prašník -RT
6: 4-6mm prašník +RT
7: barnázový prašník -RT
8: barnázový prašník +RT
9: <mikrospora -RT
10: <mikrospora +RT

Pruny 1-8: použitý materiál polyA + mRNA
Pruhy 9-10: použitá celá RNA

Obr. 1

06.03.02

A) MEDIÁTOROVÁ MAC2 SONDA



B) ANTIMEDIÁTOROVÁ MAC2 SONDA



Obr. 2

Sekvence cDNA Mac2

Předpokládaný signální peptid je znázorněn na spodním řádku.

Obr. 3(I)

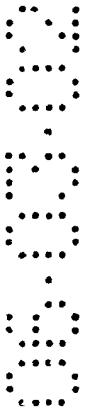
```
                                                                                                  Mac2t1
GAGGCATCGCCAAGCAAGTGGAGTAGTACGATGGTGATCAATAGGCCGCAGTTAGTTTCTAGTATAATAGTCTGTTTT    78
                                    m  v  i  n  r  p  q  l  v  s  s  i  i  v  c  f
  <ACCTGCTGTTTTGCACCTCCAC
GCAACCTGCTGTTTTGCACCTCCACCGCCTATCCACCACATGTATGTTGACATCACTACTCAGACTTACAATAGTTTA   156
a  t  c  c  f  a  P  P  P  P  I  H  H  M  Y  V  D  I  T  T  Q  T  Y  N  S  L


                                                                  Mac2t2 <CCAAGAGGTCATGCAAAGATACG
TATATTGAGTTTGCAAATCTGCTCAAGATCCCGATAGGGCCTGTATATGATCCCCAAGAGGTCATGCAAAGATACGTT   234
Y  I  E  F  A  N  L  L  K  I  P  I  G  P  V  Y  D  P  Q  E  V  M  Q  R  Y  V

CTCGGACCTCGCCGCTTTGGTTTTTATGATGAGCCACCTGAATGGATATATATTCATGTCGTCGGGGAAGAACAAGAC   312
L  G  P  R  R  F  G  F  Y  D  E  P  P  E  W  I  Y  I  H  V  V  G  E  E  Q  D

 Mac2t1 <CTGGCCATAGCCATTGATGACT
AAGGTAACTCTGGCCATAGCCATTGATGACTTATGTCTTATTGGCTTCAGTAATGCTAGTGACCATTGGTACAAGTTT   390
K  V  T  L  A  I  A  I  D  D  L  C  L  I  G  F  S  N  A  S  D  H  W  Y  K  F

AATGGACAGTCATCATCGTTCAAAGGTTTGCCGGGAGCCACCGTGCTACCGATCAGACAAAATTATCAAGATTTGATC   468
N  G  Q  S  S  S  F  K  G  L  P  G  A  T  V  L  P  I  R  Q  N  Y  Q  D  L  I
```



```
AAAGGACACGCCAACCTTTGGAAGGTTCCTCTGGGGAAGAAGTCAGCCATACATGCCACCAAGCAGCTTGCGACGTAT  546
K  G  H  A  N  L  W  K  V  P  L  G  K  K  S  A  I  H  A  T  K  Q  L  A  T  Y

GACCGAGCCGTCACCCCTGACTCCGAACTCAAGGACGGGCTGGTTAGGTTCGTGGTGATGATGTGTGAAGGCATGCGG  624
D  R  A  V  T  P  D  S  E  L  K  D  G  L  V  R  F  V  V  M  M  C  E  G  M  R

TTCCGATCGATCCGCGACATGTTCTCATCGTTGTCGGGCAATAACTGGGAGGAGGAGACCTTCATCACTGAGCTCCAA  702
F  R  S  I  R  D  M  F  S  S  L  S  G  N  N  W  E  E  E  T  F  I  T  E  L  Q

GCAAAATCTGTCGTCTACTGGTCACAACTCTCGATGCTACTCATTCGGTGGGAGCTAACCGGAAGGCTGCCCGGGGGG  780
A  K  S  V  V  Y  W  S  Q  L  S  M  L  L  I  R  W  E  L  T  G  R  L  P  G  G

CCAAAATGGGGTGCTGTTGATGGTCGATATAACAGTATGGCTAAGCATGTCCAAGAGGCTATTAATGTCAATGATGCG  858
P  K  W  G  A  V  D  G  R  Y  N  S  M  A  K  H  V  Q  E  A  I  N  V  N  D  A

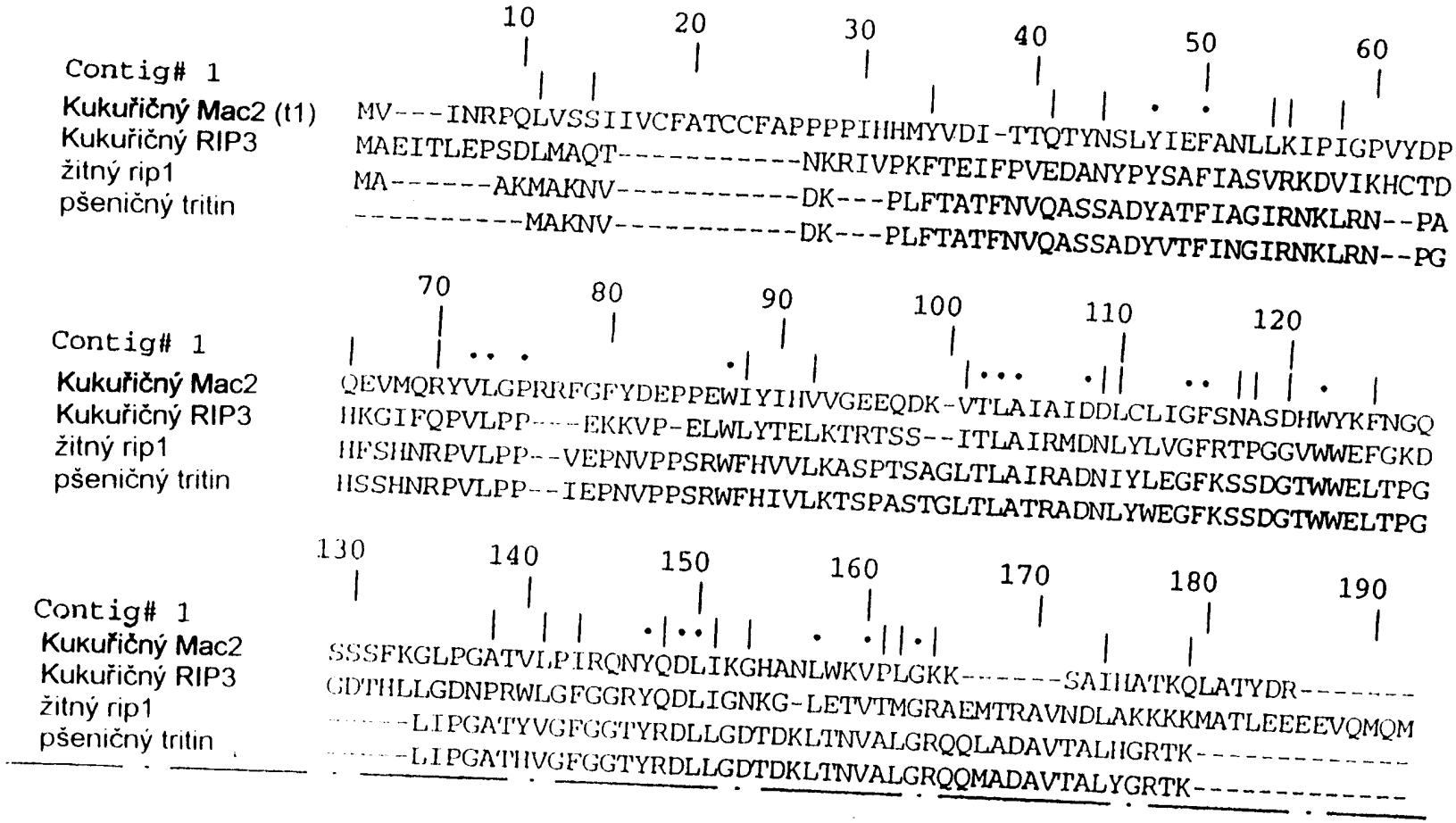
AACGATGCTTTGACAATCATTGATTTTCTGCTTCGCCCAACAGAGGAAGTAGATACTGGTAATTAGTTTTAATATATA  936
N  D  A  L  T  I  I  D  F  L  L  R  P  T  E  E  V  D  T  G  N  *

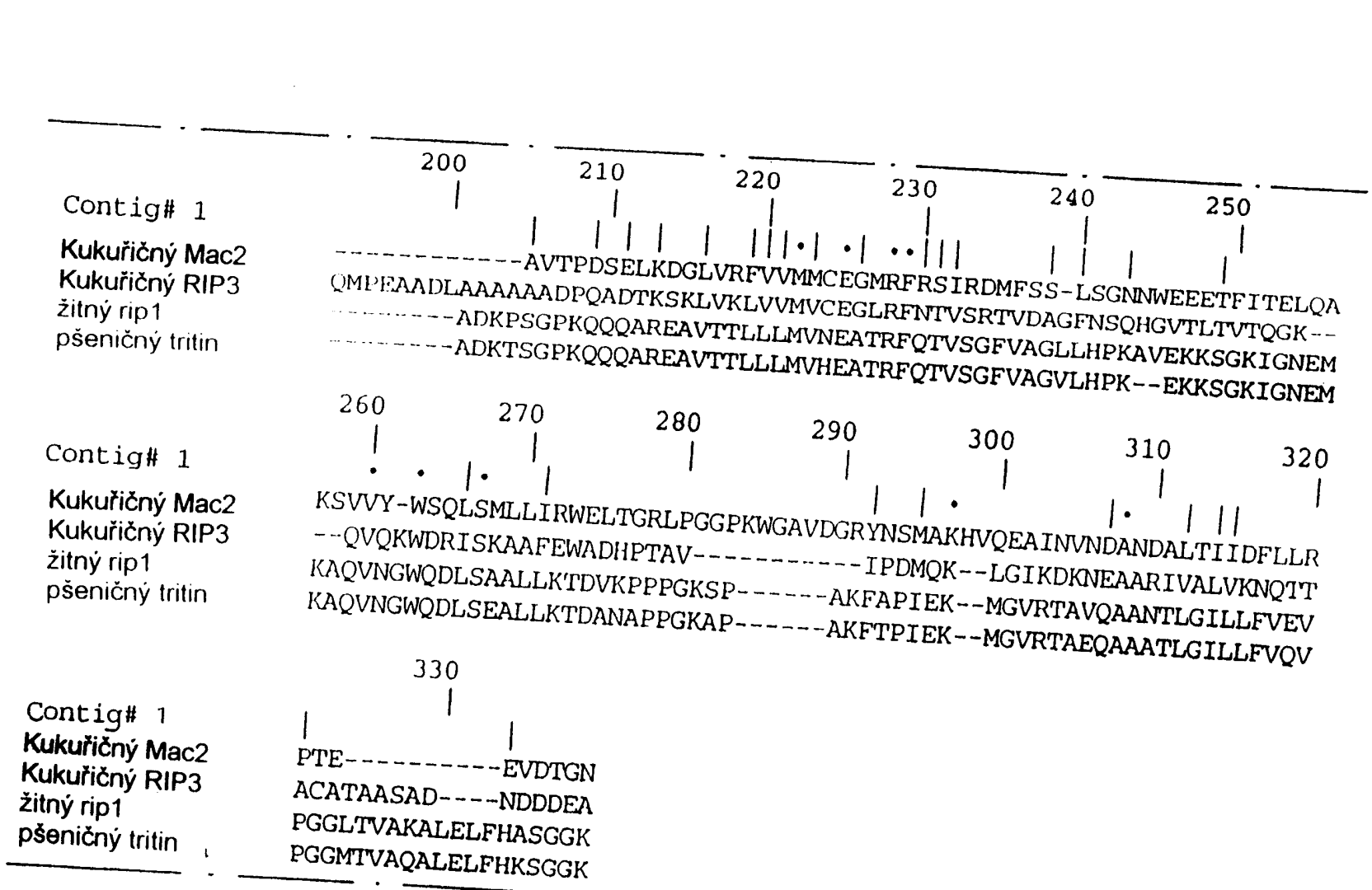
TAATTATTAGTTACGTCATCGATCTGTTGTAATAGTTTATATATACCTCTAATATTAAAAAAGTAAAATTTCAGCCTT 1014

GTTTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
                                                                                  1050
```

Obr. 3(II)

Obr. 4(I)


Contig# 1
Kukuřičný Mac2 (t1)
Kukuřičný RIP3
žitný rip1
pšeničný tritin
MV---INRPQLVSSIIVCFATCCFAPPPPIHHMYVDI-TTQTYNSLYIEFANLLKIPIGPVYDP
MAEITLEPSDLMAQT----------NKRIVPKFTEIFPVEDANYPYSAFIASVRKDVIKHCTD
MA------AKMAKNV----------DK---PLFTATFNVQASSADYATFIAGIRNKLRN--PA
----------MAKNV----------DK---PLFTATFNVQASSADYVTFINGIRNKLRN--PG
Contig# 1
Kukuřičný Mac2
Kukuřičný RIP3
žitný rip1
pšeničný tritin
QEVMQRYVLGPRRFGFYDEPPEWIYIHVVGEEQDK-VTLAIAIDDLCLIGFSNASDHWYKFNGQ
HKGIFQPVLPP----EKKVP-ELWLYTELKTRTSS--ITLAIRMDNLYLVGFRTPGGVWWEFGKD
HFSHNRPVLPP--VEPNVPPSRWFHVVLKASPTSAGLTLAIRADNIYLEGFKSSDGTWWELTPG
HSSHNRPVLPP--IEPNVPPSRWFHIVLKTSPASTGLTLATRADNLYWEGFKSSDGTWWELTPG
Contig# 1
Kukuřičný Mac2
Kukuřičný RIP3
žitný rip1
pšeničný tritin
SSSFKGLPGATVLPIRQNYQDLIKGHANLWKVPLGKK-------SAIHATKQLATYDR-------
GDTHLLGDNPRWLGFGGRYQDLIGNKG-LETVTMGRAEMTRAVNDLAKKKKMATLEEEEVQMQM
------LIPGATYVGFGGTYRDLLGDTDKLTNVALGRQQLADAVTALHGRTK------------
------LIPGATHVGFGGTYRDLLGDTDKLTNVALGRQQMADAVTALYGRTK------------


200 210 220 230 240 250
Contig# 1
Kukuričný Mac2 ----------AVTPDSELKDGLVRFVVMMCEGMRFRSIRDMFSS-LSGNNWEEETFITELQA
Kukuričný RIP3 QMPEAADLAAAAAADPQADTKSKLVKLVVMVCEGLRFNTVSRTVDAGFNSQHGVTLTVTQGK--
žitný rip1 ---------ADKPSGPKQQQAREAVTTLLLMVNEATRFQTVSGFVAGLLHPKAVEKKSGKIGNEM
pšeničný tritin ---------ADKTSGPKQQQAREAVTTLLLMVHEATRFQTVSGFVAGVLHPK--EKKSGKIGNEM
260 270 280 290 300 310 320
Contig# 1
Kukuričný Mac2 KSVVY-WSQLSMLLIRWELTGRLPGGPKWGAVDGRYNSMAKHVQEAINVNDANDALTIIDFLLR
Kukuričný RIP3 --QVQKWDRISKAAFEWADHPTAV----------IPDMQK--LGIKDKNEAARIVALVKNQTT
žitný rip1 KAQVNGWQDLSAALLKTDVKPPPGKSP------AKFAPIEK--MGVRTAVQAANTLGILLFVEV
pšeničný tritin KAQVNGWQDLSEALLKTDANAPPGKAP------AKFTPIEK--MGVRTAEQAAATLGILLFVQV
330
Contig# 1
Kukuričný Mac2 PTE----------EVDTGN
Kukuričný RIP3 ACATAASAD----NDDDEA
žitný rip1 PGGLTVAKALELFHASGGK
pšeničný tritin PGGMTVAQALELFHKSGGK

Obr. 4(II)

Poměry homologie z klustálního porovnání

kukuřičný Mac2	297 aminokyselin
kukuřičný RIP3	300 aminokyselin
žitný rip1	281 aminokyselin
pšeničný tritin	275 aminokyselin

Porovnání párů...

Porovnání kukuřičného Mac2 s:

kukuřičným RIP3	Poměr: 14,1414
žitným rip1	Poměr: 11,3879
pšeničným tritinem	Poměr: 11,2727

Porovnání kukuřičného RIP3 s:

žitným rip1	Poměr: 17,0819
pšeničným tritinem	Poměr: 16

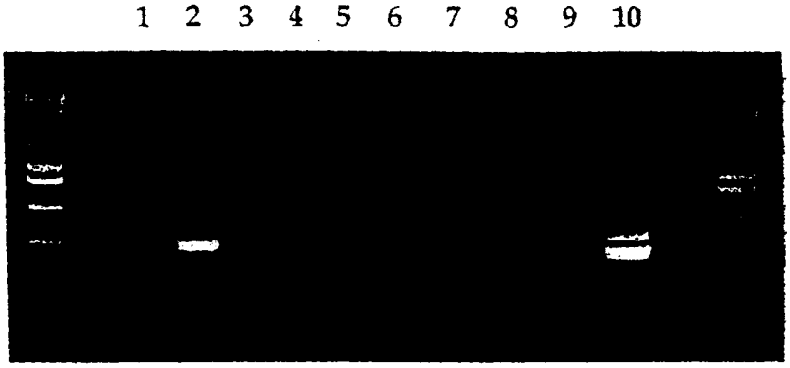
Porovnání žitného rip1 s:

pšeničným tritinem	Poměr: 87,2727

Obr. 4(III)

06.03.0

RT-PCR analýza Mac20



1: 0-2mm prašník -RT
2: 0-2mm prašník +RT
3: 2-4mm prašník -RT
4: 2-4mm prašník +RT
5: 4-6mm prašník -RT
6: 4-6mm prašník +RT
7: barnázový prašník -RT
8: barnázový prašník +RT
9: <mikrospora -RT
10: <mikrospora +RT

Pruhy 1-8: použitý materiál polyA + mRNA
Pruhy 9-10: použitá celá RNA

Obr. 5

Sekvence cDNA Mac20

Předpokládaný signální peptid je znázorněn na spodním řádku.

Obr. 6

```
GCTTCCAAACTAGAACAACACAATCCAAGAGCGCGTGGGAGAGCGAGCGAAAAAGCAAGATCAAGAGAGAGCGATCGA    78

GAGAAGACAACACAAGAAGCAATAAAGAGTCGGGGACCGGAGCGAAGGACCGATGGCCGTCTACTTCAGCATCACCGC   156
                                                                m  a  v  y  f  s  i  t  a

CTTCCTTGTCGTCATCATCCTGGTCCTGGCCGCGTGCGGCGTCGTTTTTGTCAATGTCGTCGTCATCATCTGGGGCTT   234
 f  l  v  v  i  i  l  v  l  a  a  c  g  v  v  f  v  n  v  v  v  i  i  w  g  f

CGCCCTCGCCGCGTCTCCGTTCTCGTTCTTACTGTCCAAGGTCAAGTGGCATTCGCGGCTACCGCCATCGTCACGGAT   312
 a  l  a  A  S  P  F  S  F  L  L  S  K  V  K  W  H  S  R  L  P  P  S  S  R  M

GCCGGAGGAGGAGTTGATGTTTCCGTCGCACTGGTTCGACGAAACACTACTGCAGGCGGACTCGGAGGAGGAGGTGCT   390
 P  E  E  E  L  M  F  P  S  H  W  F  D  E  T  L  L  Q  A  D  S  E  E  E  V  L

GCTTCCGACGCACTGGTTCGACGAAACACTATTGCAGGAGTCTACATCGTAGTAGACAGCCGTGATCGAGCTTGGATG   468
 L  P  T  H  W  F  D  E  T  L  L  Q  E  S  T  S  .  .

GGACGGAGTTGACGCGTCCTTTGGAACTGGATCAGTTCTTGTTCTTGAAGTTGAAGGATTCTTTCGACGTTTCTGTCA   546

CTGCATTTTTGGAACTGATCAAGGGTAGTATGCTGGTGCGTGTCGCCTGATAGTCTAGATTAGTTATTGAAACATTTT   624

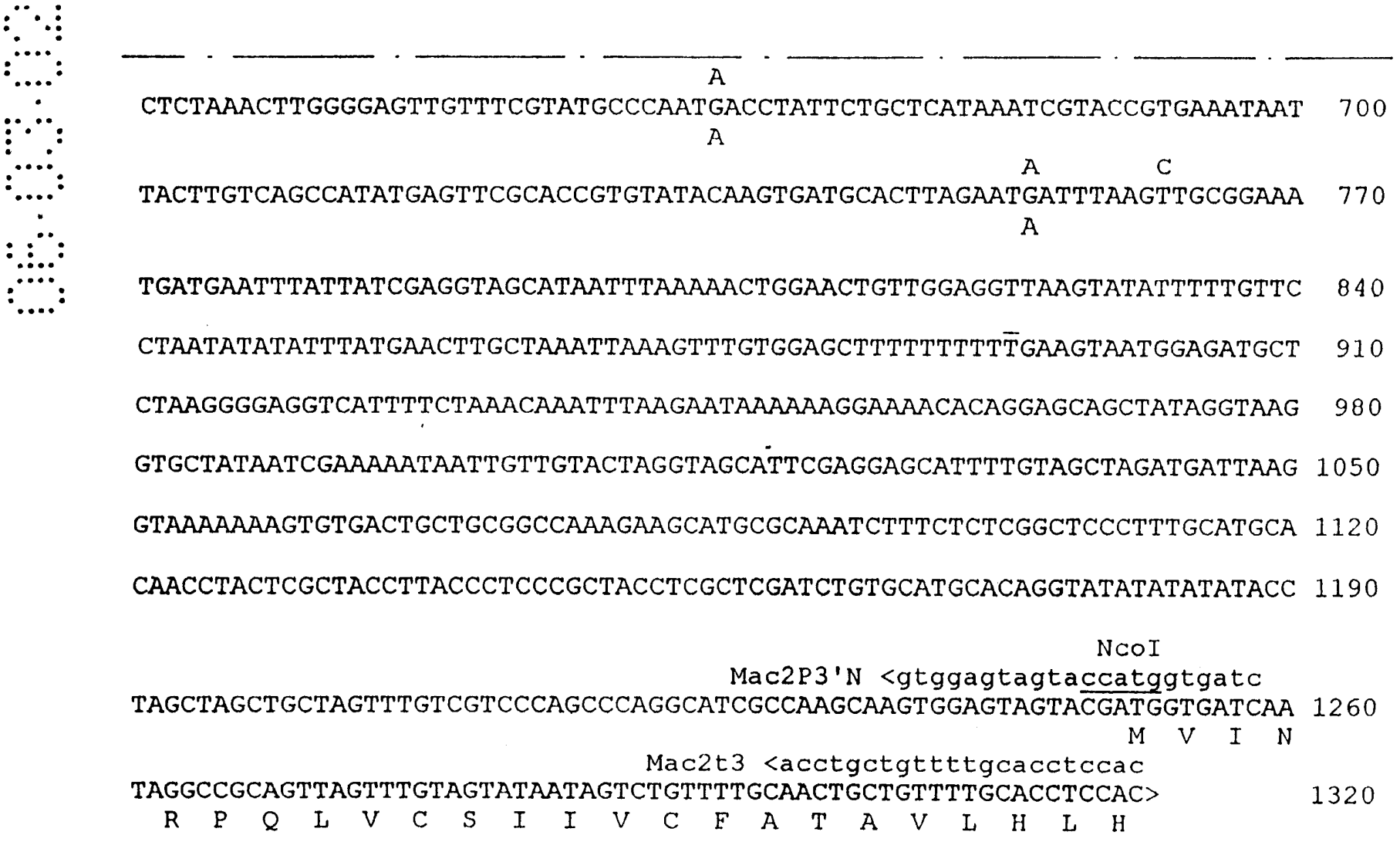
TTCATTGTTTCTGCCATTCGCTTTCTTGGAAACTATCGAGCTTAGCTGCGTTCATGCTCTTTTGTTCAGATTCGTGTT   712

CAGCTGCGACGAACTGAATTTCTTGATGCCAAGAAACGATGGTTTGTTAGTCCTTGGATCAGTTAGAGTGTTCTGACT   780

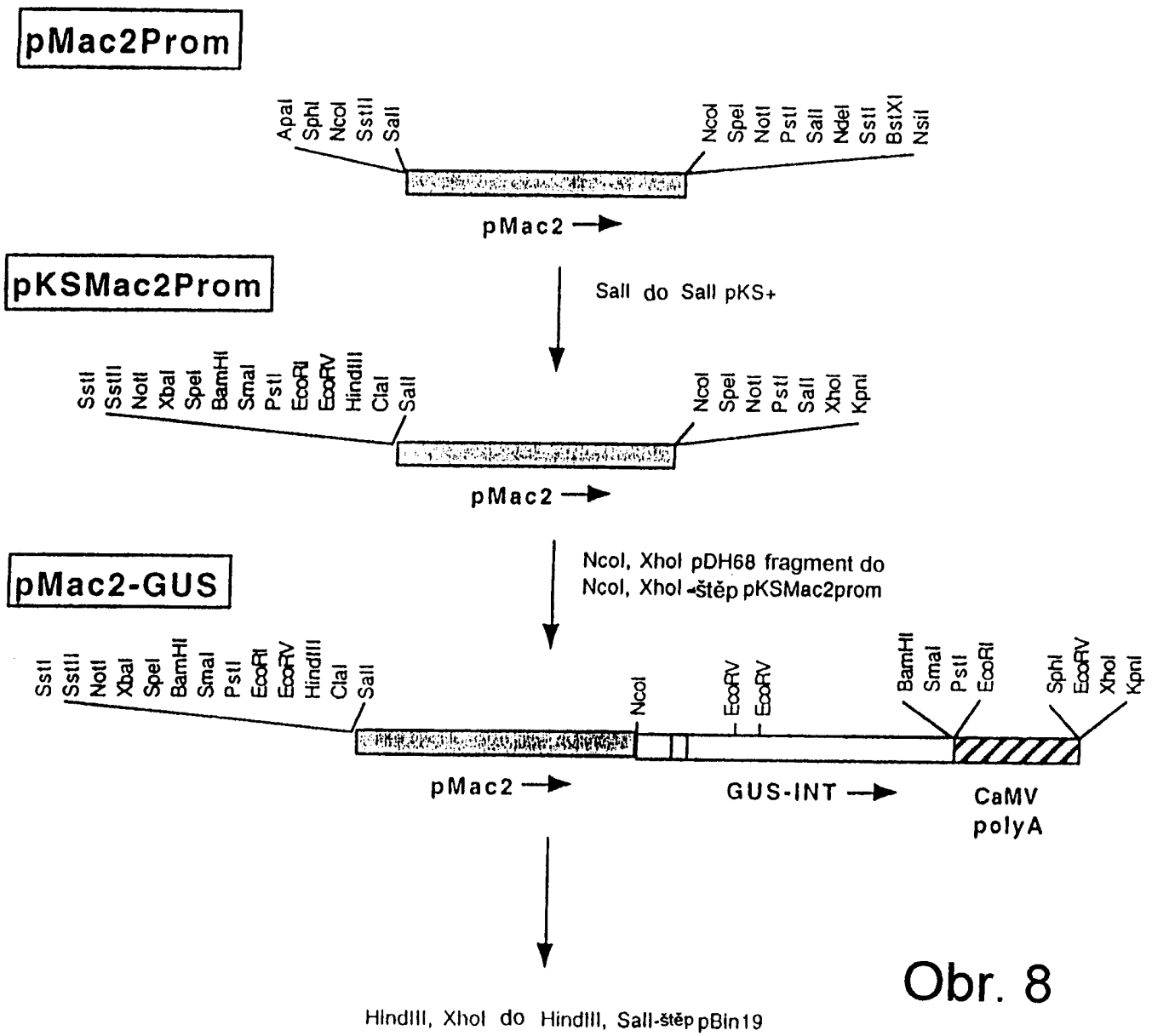
GAAGCAAAAAGATCCTTGGTTCATTGCTCTTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA                        839
```

Obr. 7(I)


SalI
ntcgastwtsgwgtt> AD1
ggtcgacttggaataatttaagttgt> NewMac2P5'
GTCGAGTATGGAGTTCGAACCCGTGTATACAAGTGATGCACTTGGAATAATTTAAGTTGTGGAAATGATG 70
T
AATTTATTATCGAGGTAGCATAATTTAAAAATTGGAACTGTTGAAGGCTAAGTATATTTTTGTTCCCAAT 140
C
ATATATTTATGAACTTGCTAAATTAAAGTTTATGGAGCTTTTTTTTTTGAAGTAATGGAGATGCTCTAAAG 210
GGAGGTCATTTTGCAAACAAATTTAAGAATAAAAAAGGAAAACACAGGAGCAGCTATAGGTAAGGTGCTA 280
A
TAATCGAAAAAGAATTGTTGTACTAGGTAGCATTCGAGGAGCATTTTGTAGCTAGATGATTAAGGTAAAA 350
-
AAAAGTGTGACTGCTGCGGCCAAAGAAGCATGCGCAAATCTTTCTCTCGGCTCCCTTTGCATGCACAACC 420
TACTCAGTCTTTAGAAAAATAAAGTTTTCAAACTAGTCCTTAGGGTGGAATTGATTCTAGCGTTTGGTTA 490
A
CGGAGGCCATCTCCATTAGTTCCCGAAAAAGAAGTTCCTAAAATTAATTTAGGGTGTTAATAACAAAAAA 560
-
AAATAATGCTCCAACAATTTCTTGAATAAGATTATCAAATATACTAAATATATATCTCTATTAATGTATT 630

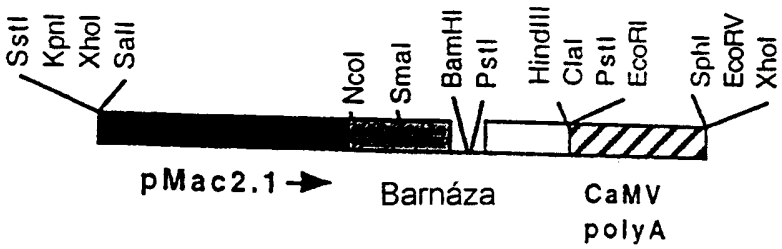

A
CTCTAAACTTGGGGAGTTGTTTCGTATGCCCAATGACCTATTCTGCTCATAAATCGTACCGTGAAATAAT 700
A
A C
TACTTGTCAGCCATATGAGTTCGCACCGTGTATACAAGTGATGCACTTAGAATGATTTAAGTTGCGGAAA 770
A
TGATGAATTTATTATCGAGGTAGCATAATTTAAAAACTGGAACTGTTGGAGGTTAAGTATATTTTTGTTC 840
CTAATATATATTTATGAACTTGCTAAATTAAAGTTTGTGGAGCTTTTTTTTTTTGAAGTAATGGAGATGCT 910
CTAAGGGGAGGTCATTTTCTAAACAAATTTAAGAATAAAAAAGGAAAACACAGGAGCAGCTATAGGTAAG 980
GTGCTATAATCGAAAAATAATTGTTGTACTAGGTAGCATTCGAGGAGCATTTTGTAGCTAGATGATTAAG 1050
GTAAAAAAAGTGTGACTGCTGCGGCCAAAGAAGCATGCGCAAATCTTTCTCTCGGCTCCCTTTGCATGCA 1120
CAACCTACTCGCTACCTTACCCTCCCGCTACCTCGCTCGATCTGTGCATGCACAGGTATATATATATACC 1190
NcoI
Mac2P3'N <gtggagtagtaccatggtgatc
TAGCTAGCTGCTAGTTTGTCGTCCCAGCCCAGGCATCGCCAAGCAAGTGGAGTAGTACGATGGTGATCAA 1260
M V I N
Mac2t3 <acctgctgttttgcacctccac
TAGGCCGCAGTTAGTTTGTAGTATAATAGTCTGTTTTGCAACTGCTGTTTTGCACCTCCAC> 1320
R P Q L V C S I I V C F A T A V L H L H

Obr. 7(II)


pMac2Prom
ApaI SphI NcoI SstII SalI
NcoI SpeI NotI PstI SalI NdeI SstI BstXI NsiI
pMac2
pKSMac2Prom
SalI do SalI pKS+
SstI SstII NotI XbaI SpeI BamHI SmaI PstI EcoRI EcoRV HindIII ClaI SalI
NcoI SpeI NotI PstI SalI XhoI KpnI
pMac2
pMac2-GUS
NcoI, XhoI pDH68 fragment do
NcoI, XhoI -štěp pKSMac2prom
SstI SstII NotI XbaI SpeI BamHI SmaI PstI EcoRI EcoRV HindIII ClaI SalI
NcoI
EcoRV EcoRV
BamHI SmaI PstI EcoRI
SphI EcoRV XhoI KpnI
pMac2
GUS-INT
CaMV
polyA
HindIII, XhoI do HindIII, SalI-štěp pBin19

Obr. 8

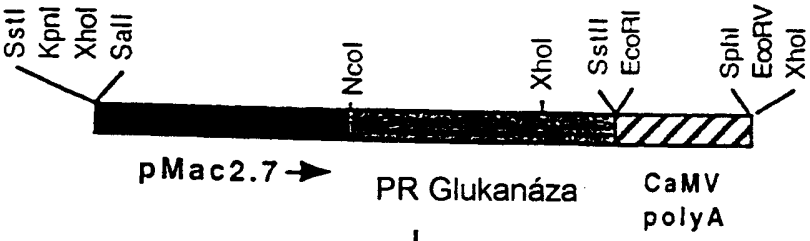
pMac2-barnáza



Obr. 9

SstI, EcoRV do SstI, SmaI pBin19

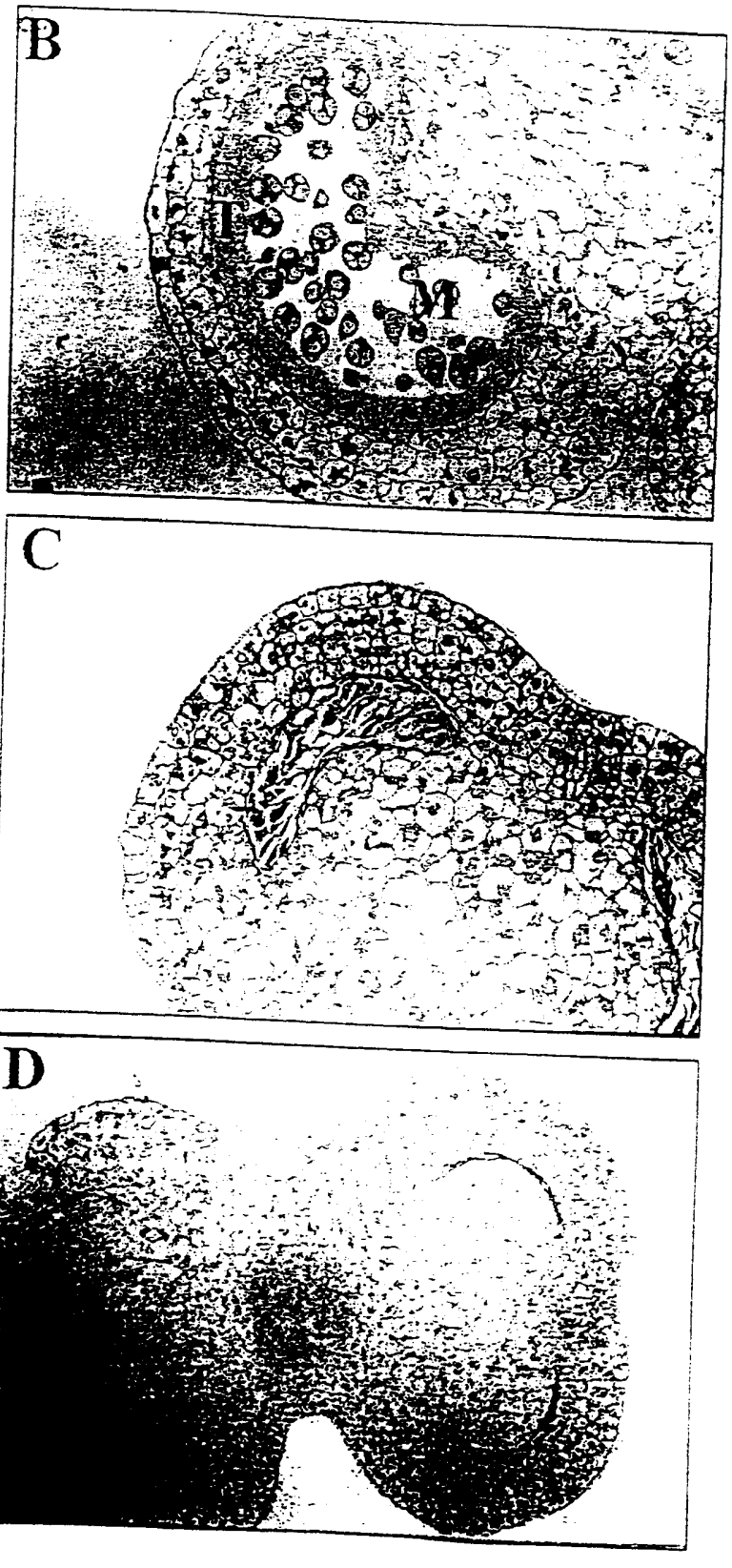
pKSMac2.-PR Glukanáza



Obr. 10

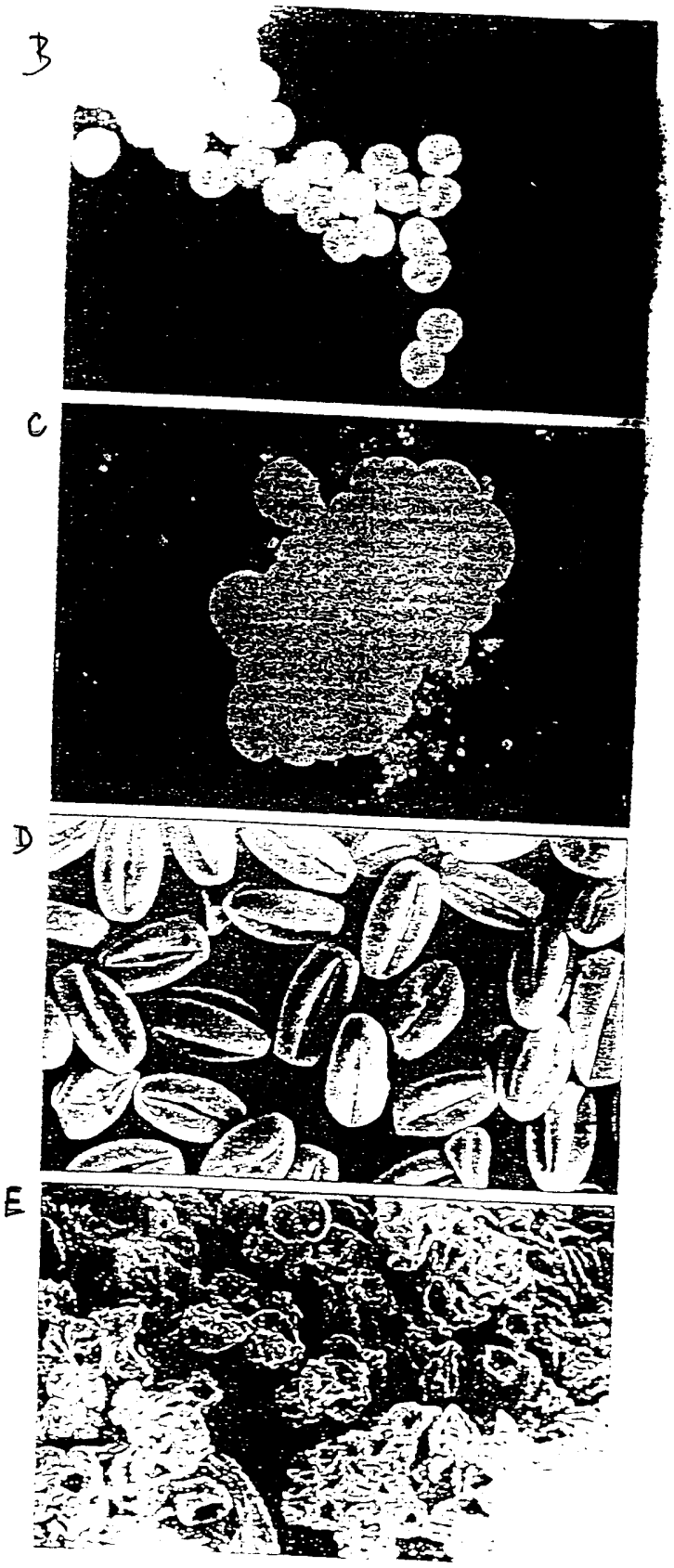
SstI, EcoRV do SstI, SmaI pBin19

20·20·90



Obr. 9
ČÁSTI B-D

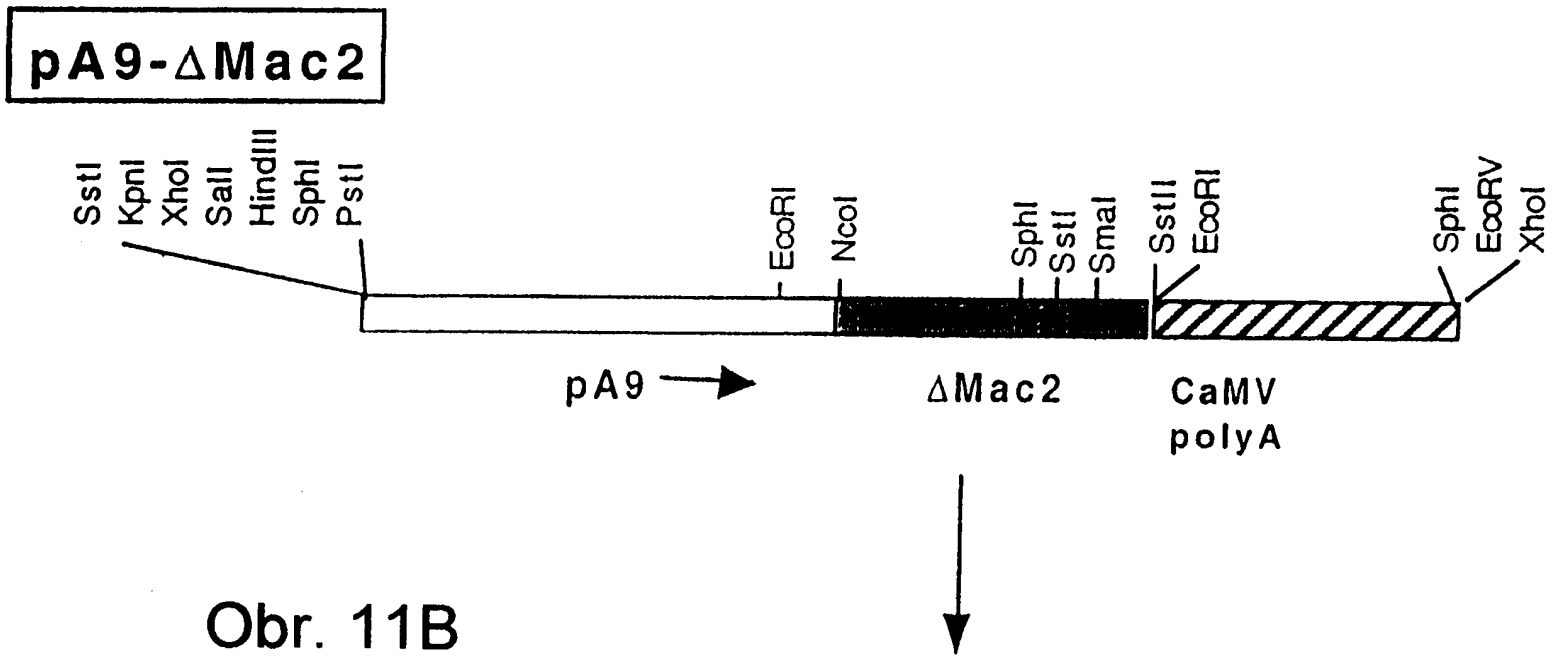
20-20-90



Obr. 10
ČÁSTI B-E


GAGGCATCGCCAAGCAAGTGGAGTAGTACGATGGTGATCAATAGGCCGCAGTTAGTTTCTAGTATAATAGTCTGTTTT 78
m v i n r p q l v s s i i v c f
NcoI
ccatggcctccaccgcctatcc> ΔMac2F
GCAACCTGCTGTTTTGCACCTCCACCGCCTATCCACCACATGTATGTTGACATCACTACTCAGACTTACAATAGTTT/ 156
a t c c f a P P P P I H H M Y V D I T T Q T Y N S L
/CAAAATGGGGTGCTGTTGATGGTCGATATAACAGTATGGCTAAGCATGTCCAAGAGGCTATTAATGTCAATGATGCG 858
P K W G A V D G R Y N S M A K H V Q E A I N V N D A
SstII
ΔMac2R <ggaagtagatactggtaattaccgcggc
AACGATGCTTTGACAATCATTGATTTTCTGCTTCGCCCAACAGAGGAAGTAGATACTGGTAATTAGTTTTAATATATA 936
N D A L T I I D F L L R P T E E V D T G N •
TAATTATTAGTTACGTCATCGATCTGTTGTAATAGTTTATATATACCTCTAATATTAAAAAAGTAAAATTTCAGCCTT 1014
GTTTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1050

Obr. 11A



Obr. 11B

HindIII, EcoRV do HindIII, SmaI pBin19

Obr. 12(I)

Sekvence genomového fragmentu Mac20, včetně 585 pb předcházejícího úseku a navržený kódující úsek Mac20

TACGGGACCCATATTTCTACAGGCGGCCCTGCTAGTATACACTATGTCTAGATGTATAGTTGGGTTTAATTTGCATTT 78

TGTCGGGTTTAATTTGCATTTTATAATTTAGAACGGAAGGAGTAGCATTTTGTCAGTTTAATTTTCATTTCTTTGTGT 156

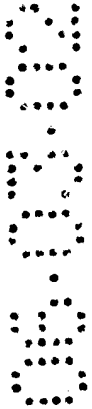
TAGTTGGGTGCCCACGCATCCAACTCTTCAAGAAGCTCTTTAGTTGTTAGGGACACTGGTACTGTCTGAAACATCGAA 234

CTATCTATAAGATTTCATTTCACAAACAAAACTTGGGAGTCTCCATTCCAACCATCCTCGCTCTTTCCATTTTCATCC 312

GGTCATCCCCCTCGCCCTCCCTGCTCTTCCAGTTTCAAGTTTGAACCGTCGCCTTTGGGAATCGAGCCGTGGGTCCCA 390

CCTTGTAAAGAACTGATCAAGCCAATCGACTTATCAACATCCTCGCTACAAATATCCGCCACCCTAATTTGGCCAAGC 468

CTTCCAAACGAAGAACAACACAATCCAAGAGCGACGTGGGAGAGCGAGCGAGAAAGCAAGATCGAGAGAAGACGACAC 546



```
AAGAAGCAATAAAGAGTCGGGGACCGGAGTGAAGGACCGATGGCCGTCTACTTCAGCATCACCGCCTTCCTTGTCGTC  624
                                        M  A  V  Y  F  S  I  T  A  F  L  V  V

ATCATCCTGGTCCTGGCCGCGTGCGGCGTCGTTTTTGTCAATGTCGTCGTCATCATATGGGGCTTCGCCCTCGCCGCG  702
I  I  L  V  L  A  A  C  G  V  V  F  V  N  V  V  V  I  I  W  G  F  A  L  A  A

TCTCCGTTCTCGTTCTTACTGTCCAAGGTCAAGTGGCATTCGCGGCCACCGCCATCGTCACGGACGTCGGAGGAGGAG  780
S  P  F  S  F  L  L  S  K  V  K  W  H  S  R  P  P  P  S  S  R  T  S  E  E  E

TTGATGTTTCCATCGCACTGGTTCGACGAAACACTACTGCAGGCGGACTCGGAGGAGGAGGTCCTGCTTCCGACGCAC  858
L  M  F  P  S  H  W  F  D  E  T  L  L  Q  A  D  S  E  E  E  V  L  L  P  T  H

TGGTTCGACGAAACACTATTGCAGGAGTCTCCATCGCAGTAGACAGGCGTGATCGAGCTTGGACGTGACGGAGTTGAC  936
W  F  D  E  T  L  L  Q  E  S  P  S  Q  *

GCGTCCTTTGGGGCGGTCTGGATCAGTTCTTGTTCTAGAAGTTGAATGATTCTTTCGACGTTTCTGTCACTGCATTTT 1014

TTGGAACTGATCAAGGGTAGTATGCTGGTGCGTGTCGCCTGATAGTCTAGATTAGTCATTGAAACATTTTTCCATTGT 1092

TTCTGCCATTCGCTTTCTTGGAAACTATCGAGCTTAGCTGC                                       1133
```

Obr. 12(II)

06.03.02

SEZNAM SEKVENCÍ

PV 2001-3986

17466

<110> BIOGEMMA UK LTD
PAUL, Wyatt
SCOTT, Roderick J
HIRD, Diane
HODGE, Rachel

<120> Tapetum-specifické promotory

<130> PWC/P21573WO

<140> PCT/GB00/01789
<141> 2000-05-10

<150> GB 9910796.3
<151> 1999-05-10

<160> 29

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 23
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: Primer

<400> 1
cccatggcct ccaccgccta tcc 23

<210> 2
<211> 28
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: Primer

<400> 2
gccgcggtaa ttaccagtat ctacttcc 28

<210> 3
<211> 26
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: Primer

<400> 3
ggtcgacttg gaataattta agttgt 26

<210> 4
<211> 22
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: Primer

<400> 4
gatcaccatg gtactactcc ac 22

<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: Primer

<400> 5
agtcatcaat ggctatggcc ag 22

<210> 6
<211> 23

<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: Primer

<400> 6
cgtatctttg catgacctct tgg 23

<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: Primer

<400> 7
gtggaggtgc aaaacagcag gt 22

<210> 8
<211> 15
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: Primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)
<223> n is a, t, g, or c

<400> 8
ntcgastwts gwgtt 15

<210> 9
<211> 1050
<212> DNA

06.03.02

<213> Zea mays

<220>
<221> CDS
<222> (31)..(924)

<400> 9

```
gaggcatcgc caagcaagtg gagtagtacg atg gtg atc aat agg ccg cag tta  54
                                Met Val Ile Asn Arg Pro Gln Leu
                                  1               5

gtt tct agt ata ata gtc tgt ttt gca acc tgc tgt ttt gca cct cca  102
Val Ser Ser Ile Ile Val Cys Phe Ala Thr Cys Cys Phe Ala Pro Pro
     10                  15                  20

ccg cct atc cac cac atg tat gtt gac atc act act cag act tac aat  150
Pro Pro Ile His His Met Tyr Val Asp Ile Thr Thr Gln Thr Tyr Asn
 25                  30                  35                  40

agt tta tat att gag ttt gca aat ctg ctc aag atc ccg ata ggg cct  198
Ser Leu Tyr Ile Glu Phe Ala Asn Leu Leu Lys Ile Pro Ile Gly Pro
                 45                  50                  55

gta tat gat ccc caa gag gtc atg caa aga tac gtt ctc gga cct cgc  246
Val Tyr Asp Pro Gln Glu Val Met Gln Arg Tyr Val Leu Gly Pro Arg
             60                  65                  70

cgc ttt ggt ttt tat gat gag cca cct gaa tgg ata tat att cat gtc  294
Arg Phe Gly Phe Tyr Asp Glu Pro Pro Glu Trp Ile Tyr Ile His Val
         75                  80                  85

gtc ggg gaa gaa caa gac aag gta act ctg gcc ata gcc att gat gac  342
Val Gly Glu Glu Gln Asp Lys Val Thr Leu Ala Ile Ala Ile Asp Asp
     90                  95                 100

tta tgt ctt att ggc ttc agt aat gct agt gac cat tgg tac aag ttt  390
Leu Cys Leu Ile Gly Phe Ser Asn Ala Ser Asp His Trp Tyr Lys Phe
105                 110                 115                 120

aat gga cag tca tca tcg ttc aaa ggt ttg ccg gga gcc acc gtg cta  438
Asn Gly Gln Ser Ser Ser Phe Lys Gly Leu Pro Gly Ala Thr Val Leu
                125                 130                 135
```

06.03.02

ccg atc aga caa aat tat caa gat ttg atc aaa gga cac gcc aac ctt 486
Pro Ile Arg Gln Asn Tyr Gln Asp Leu Ile Lys Gly His Ala Asn Leu
140 145 150

tgg aag gtt cct ctg ggg aag aag tca gcc ata cat gcc acc aag cag 534
Trp Lys Val Pro Leu Gly Lys Lys Ser Ala Ile His Ala Thr Lys Gln
155 160 165

ctt gcg acg tat gac cga gcc gtc acc cct gac tcc gaa ctc aag gac 582
Leu Ala Thr Tyr Asp Arg Ala Val Thr Pro Asp Ser Glu Leu Lys Asp
170 175 180

ggg ctg gtt agg ttc gtg gtg atg atg tgt gaa ggc atg cgg ttc cga 630
Gly Leu Val Arg Phe Val Val Met Met Cys Glu Gly Met Arg Phe Arg
185 190 195 200

tcg atc cgc gac atg ttc tca tcg ttg tcg ggc aat aac tgg gag gag 678
Ser Ile Arg Asp Met Phe Ser Ser Leu Ser Gly Asn Asn Trp Glu Glu
205 210 215

gag acc ttc atc act gag ctc caa gca aaa tct gtc gtc tac tgg tca 726
Glu Thr Phe Ile Thr Glu Leu Gln Ala Lys Ser Val Val Tyr Trp Ser
220 225 230

caa ctc tcg atg cta ctc att cgg tgg gag cta acc gga agg ctg ccc 774
Gln Leu Ser Met Leu Leu Ile Arg Trp Glu Leu Thr Gly Arg Leu Pro
235 240 245

ggg ggg cca aaa tgg ggt gct gtt gat ggt cga tat aac agt atg gct 822
Gly Gly Pro Lys Trp Gly Ala Val Asp Gly Arg Tyr Asn Ser Met Ala
250 255 260

aag cat gtc caa gag gct att aat gtc aat gat gcg aac gat gct ttg 870
Lys His Val Gln Glu Ala Ile Asn Val Asn Asp Ala Asn Asp Ala Leu
265 270 275 280

aca atc att gat ttt ctg ctt cgc cca aca gag gaa gta gat act ggt 918
Thr Ile Ile Asp Phe Leu Leu Arg Pro Thr Glu Glu Val Asp Thr Gly
285 290 295

aat tag ttttaatata tataattatt agttacgtca tcgatctgtt gtaatagttt 974

06.03.02

Asn

atatatacct ctaatattaa aaaagtaaaa tttcagcctt gtttccaaaa aaaaaaaaaa 1034

aaaaaaaaaa aaaaaa 1050

<210> 10
<211> 297
<212> PRT
<213> Zea mays

<400> 10

Met Val Ile Asn Arg Pro Gln Leu Val Ser Ser Ile Ile Val Cys Phe
1 5 10 15

Ala Thr Cys Cys Phe Ala Pro Pro Pro Pro Ile His His Met Tyr Val
20 25 30

Asp Ile Thr Thr Gln Thr Tyr Asn Ser Leu Tyr Ile Glu Phe Ala Asn
35 40 45

Leu Leu Lys Ile Pro Ile Gly Pro Val Tyr Asp Pro Gln Glu Val Met
50 55 60

Gln Arg Tyr Val Leu Gly Pro Arg Arg Phe Gly Phe Tyr Asp Glu Pro
65 70 75 80

Pro Glu Trp Ile Tyr Ile His Val Val Gly Glu Glu Gln Asp Lys Val
85 90 95

Thr Leu Ala Ile Ala Ile Asp Asp Leu Cys Leu Ile Gly Phe Ser Asn
100 105 110

Ala Ser Asp His Trp Tyr Lys Phe Asn Gly Gln Ser Ser Ser Phe Lys
115 120 125

Gly Leu Pro Gly Ala Thr Val Leu Pro Ile Arg Gln Asn Tyr Gln Asp
130 135 140

Leu Ile Lys Gly His Ala Asn Leu Trp Lys Val Pro Leu Gly Lys Lys
145 150 155 160

06.03.02

Ser Ala Ile His Ala Thr Lys Gln Leu Ala Thr Tyr Asp Arg Ala Val
165 170 175

Thr Pro Asp Ser Glu Leu Lys Asp Gly Leu Val Arg Phe Val Val Met
180 185 190

Met Cys Glu Gly Met Arg Phe Arg Ser Ile Arg Asp Met Phe Ser Ser
195 200 205

Leu Ser Gly Asn Asn Trp Glu Glu Glu Thr Phe Ile Thr Glu Leu Gln
210 215 220

Ala Lys Ser Val Val Tyr Trp Ser Gln Leu Ser Met Leu Leu Ile Arg
225 230 235 240

Trp Glu Leu Thr Gly Arg Leu Pro Gly Gly Pro Lys Trp Gly Ala Val
245 250 255

Asp Gly Arg Tyr Asn Ser Met Ala Lys His Val Gln Glu Ala Ile Asn
260 265 270

Val Asn Asp Ala Asn Asp Ala Leu Thr Ile Ile Asp Phe Leu Leu Arg
275 280 285

Pro Thr Glu Glu Val Asp Thr Gly Asn
290 295

<210> 11
<211> 22
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: Primer

<400> 11
acctgctgtt ttgcacctcc ac 22

<210> 12
<211> 23
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: Primer

<400> 12
ccaagaggtc atgcaaagat acg 23

<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: Primer

<400> 13
ctggccatag ccattgatga ct 22

<210> 14
<211> 300
<212> PRT
<213> Zea mays

<400> 14
Met Ala Glu Ile Thr Leu Glu Pro Ser Asp Leu Met Ala Gln Thr Asn
1 5 10 15

Lys Arg Ile Val Pro Lys Phe Thr Glu Ile Phe Pro Val Glu Asp Ala
20 25 30

Asn Tyr Pro Tyr Ser Ala Phe Ile Ala Ser Val Arg Lys Asp Val Ile
35 40 45

Lys His Cys Thr Asp His Lys Gly Ile Phe Gln Pro Val Leu Pro Pro
50 55 60

08.03.02

```
Glu Lys Lys Val Pro Glu Leu Trp Leu Tyr Thr Glu Leu Lys Thr Arg
 65                  70                  75                  80

Thr Ser Ser Ile Thr Leu Ala Ile Arg Met Asp Asn Leu Tyr Leu Val
                 85                  90                  95

Gly Phe Arg Thr Pro Gly Gly Val Trp Trp Glu Phe Gly Lys Asp Gly
            100                 105                 110

Asp Thr His Leu Leu Gly Asp Asn Pro Arg Trp Leu Gly Phe Gly Gly
        115                 120                 125

Arg Tyr Gln Asp Leu Ile Gly Asn Lys Gly Leu Glu Thr Val Thr Met
    130                 135                 140

Gly Arg Ala Glu Met Thr Arg Ala Val Asn Asp Leu Ala Lys Lys Lys
145                 150                 155                 160

Lys Met Ala Thr Leu Glu Glu Glu Glu Val Gln Met Gln Met Gln Met
                165                 170                 175

Pro Glu Ala Ala Asp Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Asp Pro Gln Ala
            180                 185                 190

Asp Thr Lys Ser Lys Leu Val Lys Leu Val Val Met Val Cys Glu Gly
        195                 200                 205

Leu Arg Phe Asn Thr Val Ser Arg Thr Val Asp Ala Gly Phe Asn Ser
    210                 215                 220

Gln His Gly Val Thr Leu Thr Val Thr Gln Gly Lys Gln Val Gln Lys
225                 230                 235                 240

Trp Asp Arg Ile Ser Lys Ala Ala Phe Glu Trp Ala Asp His Pro Thr
                245                 250                 255

Ala Val Ile Pro Asp Met Gln Lys Leu Gly Ile Lys Asp Lys Asn Glu
            260                 265                 270

Ala Ala Arg Ile Val Ala Leu Val Lys Asn Gln Thr Thr Ala Cys Ala
        275                 280                 285
```

06.03.02

Thr Ala Ala Ser Ala Asp Asn Asp Asp Asp Glu Ala
290 295 300

<210> 15
<211> 281
<212> PRT
<213> Hordeum vulgare

<400> 15
Met Ala Ala Lys Met Ala Lys Asn Val Asp Lys Pro Leu Phe Thr Ala
1 5 10 15

Thr Phe Asn Val Gln Ala Ser Ser Ala Asp Tyr Ala Thr Phe Ile Ala
20 25 30

Gly Ile Arg Asn Lys Leu Arg Asn Pro Ala His Phe Ser His Asn Arg
35 40 45

Pro Val Leu Pro Pro Val Glu Pro Asn Val Pro Pro Ser Arg Trp Phe
50 55 60

His Val Val Leu Lys Ala Ser Pro Thr Ser Ala Gly Leu Thr Leu Ala
65 70 75 80

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

Thr Trp Trp Glu Leu Thr Pro Gly Leu Ile Pro Gly Ala Thr Tyr Val
100 105 110

Gly Phe Gly Gly Thr Tyr Arg Asp Leu Leu Gly Asp Thr Asp Lys Leu
115 120 125

Thr Asn Val Ala Leu Gly Arg Gln Gln Leu Ala Asp Ala Val Thr Ala
130 135 140

Leu His Gly Arg Thr Lys Ala Asp Lys Pro Ser Gly Pro Lys Gln Gln
145 150 155 160

Gln Ala Arg Glu Ala Val Thr Thr Leu Leu Leu Met Val Asn Glu Ala

06.03.02

165 170 175

Thr Arg Phe Gln Thr Val Ser Gly Phe Val Ala Gly Leu Leu His Pro
180 185 190

Lys Ala Val Glu Lys Lys Ser Gly Lys Ile Gly Asn Glu Met Lys Ala
195 200 205

Gln Val Asn Gly Trp Gln Asp Leu Ser Ala Ala Leu Leu Lys Thr Asp
210 215 220

Val Lys Pro Pro Pro Gly Lys Ser Pro Ala Lys Phe Ala Pro Ile Glu
225 230 235 240

Lys Met Gly Val Arg Thr Ala Val Gln Ala Ala Asn Thr Leu Gly Ile
245 250 255

Leu Leu Phe Val Glu Val Pro Gly Gly Leu Thr Val Ala Lys Ala Leu
260 265 270

Glu Leu Phe His Ala Ser Gly Gly Lys
275 280

<210> 16
<211> 275
<212> PRT
<213> Triticum aestivum

<400> 16
Met Ala Lys Asn Val Asp Lys Pro Leu Phe Thr Ala Thr Phe Asn Val
1 5 10 15

Gln Ala Ser Ser Ala Asp Tyr Val Thr Phe Ile Asn Gly Ile Arg Asn
20 25 30

Lys Leu Arg Asn Pro Gly His Ser Ser His Asn Arg Pro Val Leu Pro
35 40 45

Pro Ile Glu Pro Asn Val Pro Pro Ser Arg Trp Phe His Ile Val Leu
50 55 60

06.03.02

Lys Thr Ser Pro Ala Ser Thr Gly Leu Thr Leu Ala Thr Arg Ala Asp
65 70 75 80

Asn Leu Tyr Trp Glu Gly Phe Lys Ser Ser Asp Gly Thr Trp Trp Glu
85 90 95

Leu Thr Pro Gly Leu Ile Pro Gly Ala Thr His Val Gly Phe Gly Gly
100 105 110

Thr Tyr Arg Asp Leu Leu Gly Asp Thr Asp Lys Leu Thr Asn Val Ala
115 120 125

Leu Gly Arg Gln Gln Met Ala Asp Ala Val Thr Ala Leu Tyr Gly Arg
130 135 140

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

Ala Val Thr Thr Leu Leu Leu Met Val His Glu Ala Thr Arg Phe Gln
165 170 175

Thr Val Ser Gly Phe Val Ala Gly Val Leu His Pro Lys Glu Lys Lys
180 185 190

Ser Gly Lys Ile Gly Asn Glu Met Lys Ala Gln Val Asn Gly Trp Gln
195 200 205

Asp Leu Ser Glu Ala Leu Leu Lys Thr Asp Ala Asn Ala Pro Pro Gly
210

??
??cagtttcaa gtttgaaccg 360

tcgcctttgg gaatcgagcc gtgggtccca ccttgtaaag aactgatcaa gccaatcgac 420

ttatcaacat
cctcgctaca??
??

cgacacaaga agcaataaag agtcggggac cggagtgaag gaccg atg gcc gtc tac 597

M??

06-03-02

?? Val Asn Val Val Val Ile Ile

Trp Gly Phe Ala

25 30 35

ctc gcc gcg

tct??

??

cca tcg cac tgg ttc gac gaa aca cta ctg cag gcg gac tcg gag gag 837

Pro Ser His Trp Phe Asp Glu Thr Leu Leu

G??

??

??????????<ttttttttttttt???

??

??ttttttttttttttt

?tt??

????ttttttttttttttttttttt?tt???

??

??ttttttttttttttttttttt?tt????????

??

??

??????????????????ttttttttttttttttttt?tt?????????????????????????????????????

??

??

????????????????????????????????ttttttt?????????????????ttttttttttttttttt?ttttt

tt?ttttttt???4?4?4???????4?4???????4?4???4??t?'t??????????????????????????????

??

??ttttt????4???4?4???4???4???????

????????4t??t????5?????5???????5?5?????????????ttttttttt?ttttttttt?ttttttttt?tt??

???4?4??

??°?5?????5

?°????????????tttt?ttttttttt?ttttttttt?tttttt?????????????????4?????????4?4??t?

't??????5?5???°???????5?????????°??

??

?ttttttt?????4?????????????????4?????????????t??t?????????????????5???????????

??ttttttt??ttttttttt??ttttttttt??tt?????????????4?4????????????????????????????

??

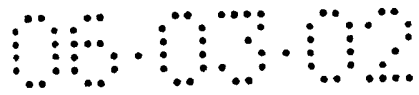
????????????????????????5?????????????????????????ttt??ttttttttt??ttttttttt??ttttttt?

??4?????4???????????4?????????????t?'t??5???????°????????????°???5?????????????????

??

????????????????????????????????tttttttt?????????????????????????4????????t

??t?????????°?4???????5??????????°?5???ttttttt??ttttttttt??ttttttttt??ttt???????????4




```
????????????????????????????????????????????????????????????????????????????????????
????????????????????????????????????????????????????????5???4?5?5?????°?5?5???????5
???ttt??ttttttttt??ttttttttt??tttttt?????????????4?4?4?4?4???4???4???4t?'t????????
??°????????°????????????????????????????????????????????????????????????????????
????????????????????????????????????????????????????????????????ttt??tttttttt??
???????4?4?4???4?????????????4?4?4t??t????????°???5?5???????5?5???°????ttttttt?
?tttttttt??tttttttt??ttt???4????????????????????????????????????????????????????
????????????????????????????????????????????????????????????????????????????????
?tttttt??t?????????????????????????????4????????????5?????????????????????ttt
tttt?tttttttttt?tttttttttt?ttt?????????????????????????????????????????????????
????????????????????????????????????????????????????????????????????????????????
??????????????????????????°?????5???4??tt?ttttttttt?ttttttttt?ttttttttt????????
???5?????????????????°?5????ttttttttt?ttttttttt?ttttttttt?t?????????????????????
????????????????????????????????????????????????????????????????????????????????
????????????????????????????ttt???????°???°?????????????????????????ttt??ttt
ttttt??tttttttt??tttttttt?????5???????????5??????????????°??t??tttttttt??tttttttt
t?????????????????????????????????????????????????????????????????????????????
????????????????????????????????????????????ttttt??tttttttt??ttt???????°???5
?5???°???5???????????4??tttttt??tttttttt??tttttttt??tttttt???4???5???4????????????
?°?4????????ttt?????????????????????????????????????????????????????????????????
????????????????????????????????????????????????????????????????ttttttttttttttt
t?ttttttttt?tt?????????????????°?°?5???????°????tttttt??tttttttt??tttttttt??ttt
t????°?????5?5????°????????°?5?????????????????????????????????????????????????
????????????????????????????????????????????????????????????????????????????????
???????????ttttttttt??tttttttt??tttttttt???????4????5?5?5?5?5?????4???4???4??tt
ttttt??tttttttt??tttttttt??tttttttt?????5??????°?5?????????????????????????????
????????????????????????????????????????????????????????????????????????????????
????????????????????????°?????????????t??tttttttt??tttttttt??tttttttt??????????
???5?????????????????????????ttttttttt??tttttttt??tttttttt?????°?°?????????????
????????????????????????????????????????????????????????????????????????????????
??????????????????????????????????????5?????????????????ttt??tttttttt
??ttttttttt??tttttt?????????????°????°?°?°5??ttttttttt??t??tttttttt??tttttttt?????
????????????????????????????????????????????????????????????????????????????????
????????????????????????????????????????????????ttttttttt??tttttttt??tttttttt
t??t????°?5?5???????5???????????°????????ttttttt??tttttttt??tttttttt??ttt???°????
???????4????????????????????????????????????????????????????????????????????????
????????????????????????????????????????????????????????????????ttttttttttttt
tt??t??tttttttt??tttttttttttttttttttt?????????????????????????????????????????
??????????????>????????????????????????????????????????????????????????????????
????????????????????????????????????????????????????????????????????????????????
?t?tt?????????????????????????????????????????????????>???????????????????
?????ttttttttttttttttttttt?tt?????????????????????????????????????????????????
```

06.03.02

??
??????????????????t?t?????????t????????????????????????????????°??????t???t?????
t???t?????????t?????t?????????????°?????????????????5???????t?t?????t?????????????????
??
???????????????????????????????? SCOTT, Roderick J

HIRD, Diane

HODGE, Rachel

<120> Tapetum-specifické promotory

<130> PWC/P21573WO

<140>

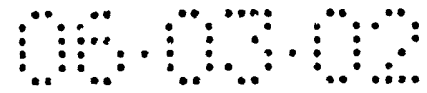
P??
??g gaa gaa caa gac aag gta act
ctg gcc ata gcc att gat gac 342
Val Gly Glu Glu Gln Asp Lys Val Thr Leu Ala Ile Ala Ile Asp
??
??Gly Leu Pro Gly Ala Thr Val Leu
                125   130   135

ccg   atc   aga   caa   aat   tat   caa
??
??   145
150

tgg aag gtt cct ctg ggg aag aag tca gcc ata cat gcc acc aag cag 534
Trp
??
??g cgg ttc cga 630
Gly Leu Val Arg Phe Val Val Met Met Cys Glu Gly Met Arg Phe Arg
185   190
??
??r Ser Leu Ser Gly Asn Asn Trp
Glu Glu
                205   210   215

gag   acc   ttc   atc   act
ga??
??

ggg ggg cca aaa tgg ggt gct gtt gat ggt cga tat aac agt atg gct 822



```
Gly    Gly    Pro    Lys    Trp    Gly    Ala    Val    Asp    Gly    Arg    Tyr
????????????????????????????????????????????????????????????????????????????????
????????????????????????????????????????????gcg aac gat gct ttg   870
Lys His Val Gln Glu Ala Ile Asn Val Asn Asp Ala Asn Asp Ala Leu
265                                                                            270
????????????????????????????????????????????????????????????????????????????????
????????????????????????????????????????????atacct  ctaatattaa  aaaagtaaaa
tttcagcctt gtttccaaaa aaaaaaaaaa 1034

aaaaaaaaaa                                                                  aaaaaa
????????????????????????????????????????????????????????????????????????????????
????????????????????????????????????????????e Ile Val Cys Phe
  1               5                  10                  15

Ala       Thr       Cys       Cys       Phe       Ala       Pro       Pro       Pro
Pr?????????????????????????????????????????????????????????????????????????????
????????????????????????????????????????????l Leu Gly Pro Arg Arg Phe Gly
Phe Tyr Asp Glu Pro
 65                  70                  75                  80

Pro
Gl?????????????????????????????????????????????????????????????????????????????
????????????????????????????????????????????
Thr Leu Ala Ile Ala Ile Asp Asp Leu Cys Leu Ile Gly Phe Ser Asn
            100                 105                 110
????????????????????????????????????????????????????????????????????????????????
????????????????????????????????????????????     155                 160

Ser Ala Ile His Ala Thr Lys Gln Leu Ala Thr Tyr Asp Arg Ala Val
                165
????????????????????????????????????????????????????????????????????????????????
????????????????????????????????????????????                                185
190

Met Cys Glu Gly Met Arg Phe Arg Ser Ile Arg Asp Met Phe Ser Ser

195????????????????????????????????????????????????????????????????????????????
????????????????????????????????????????????y Ala Val
                245                 250                 255
```

06.03.02

Asp Gly Arg Tyr Asn Ser Met Ala Lys His Val
Gl??
??e Ile Asp Phe Leu Leu Arg
275 280 285

Pro Thr Glu Glu Val Asp Thr
Gl??
??
<223> Popis umělé sekvence: Primer

<400> 12
ccaagaggtc atgcaaagat acg
??
??er

<400> 13
ctggccatag ccattgatga ct 22

<210> 14
<211> 300
<212> PRT
<2??
?? 40 45

Lys His Cys Thr Asp His Lys Gly Ile Phe Gln Pro Val Leu Pro Pro
50
??
?? 70 75
80

Thr Ser Ser Ile Thr Leu Ala Ile Arg Met Asp Asn Leu Tyr Leu Val

??
??l Thr Met
130 135 140

Gly Arg Ala Glu Met Thr Arg Ala Val Asn Asp Leu ??????????????