

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2002 - 2502

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **08.02.2001**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **09.02.2000 17.05.2000
19.12.2000**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/10005973 2000/10023893
2000/10063387**

(33) Země priority: **DE DE DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.10.2002**
(Věstník č. 10/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/EP01/01346**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/59128**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/54 G 01 N 33/573
C 12 N 15/82 C 12 Q 1/48
C 12 N 9/10 A 61 K 38/45
A 01 H 5/00
C 07 K 16/40
C 12 P 7/64
C 11 B 1/00
C 11 C 1/00

(71) Přihlašovatel:

BASF AKTIENGESELLSCHAFT, Ludwigshafen, DE;

(72) Původce:

Heinz Ernst, Hamburg, DE;
Zank Thorsten, Hamburg, DE;
Zähringer Ulrich, Borstel, DE;
Lerchl Jens, Ladenburg, DE;
Renz Andreas, Limburgerhof, DE;

(74) Zástupce:

Kalenský Petr JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Elongázový gen a způsob přípravy
polynenasycených mastných kyselin**

(57) Anotace:

Elongázový gen se sekvencí ze souboru zahrnujícího SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 3, SEQ ID NO : 5 a SEQ ID NO : 7, nebo jejich homology, deriváty nebo analogy pro genový konstrukt zahrnující tento gen nebo jeho homology, deriváty nebo analogy a jejich použití. Vektory nebo transgenické organizmy obsahující elongázový gen se sekvencí SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 3, SEQ ID NO : 5 a SEQ ID no . 7, nebo jejich homology, deriváty nebo analogy. Použití sekvence elongázového genu samotné nebo v kombinaci s jinými elongázemi a/nebo s jinými geny biosyntézy mastné kyseliny. Způsob přípravy polynenasycených mastných kyselin a způsob zavádění DNA do organismů, které produkují velké množství olejů, zvláště olejů s vysokým obsahem nenasycených mastných kyselin. Olej a/nebo produkty mastných kyselin s vysokým obsahem polynenasycených mastných kyselin s alespoň dvěma dvojnými vazbami a/nebo triacylglycerolový produkt s vyšším obsahem polynenasycených mastných kyselin s alespoň dvěma dvojnými vazbami.

CZ 2002 - 2502 A3

Elongázový gen a způsob přípravy polynenasycených mastných kyselin

Oblast techniky

Vynález se týká nového elongázového genu se sekvencemi uvedenými v sekvenci SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11 nebo jeho homologů, derivátů nebo analogů pro genový konstrukt obsahující tento gen nebo jeho homology, deriváty nebo analogy a jeho použití. Vynález se také týká vektorů nebo transgenních organismů obsahujících elongázový gen se sekvencemi uvedenými v sekvenci SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11 nebo jejich homologů, derivátů nebo analogů. Vynález se rovněž týká použití elongázových genových sekvencí samotných nebo v kombinaci s dalšími elongázami a/nebo s dalšími geny pro biosyntézu mastných kyselin. Vynález se týká nového elongázového genu se sekvencí SEQ ID NO:1 nebo jeho homologů, derivátů nebo analogů.

Vynález se také týká způsobu přípravy polynenasycených mastných kyselin a způsobů zavádění DNA do organismů, které produkují velké množství olejů, zvláště olejů s vysokým obsahem nenasycených mastných kyselin. Zvláště se vynálezu týká přípravy oleje a/nebo mastné kyseliny s vyšším obsahem polynenasycených mastných kyselin s alespoň dvěma dvojnými vazbami a/nebo přípravy triacylglycerolu s vysokým obsahem polynenasycených mastných kyselin s alespoň dvěma dvojnými vazbami.

Dosavadní stav techniky

Určité produkty a vedlejší produkty přírodně se vyskytující metabolických procesů v buňkách se mohou využít v širokém spektru průmyslových odvětví, jako jsou průmysl živočišné výživy, průmysl potravinářský, kosmetický a farmaceutický. Ty-

to molekuly, které se zde společně označují jako "jemné chemikálie" zahrnují také lipidy a mastné kyseliny, přičemž příkladem této třídy jsou polynenasycené mastné kyseliny. Polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) se například přidávají do dětské výživy ke zvýšení její výživné hodnoty. Například mají PUFA pozitivní vliv na hladinu cholesterolu v krvi lidí a jsou proto vhodné pro ochranu proti onemocnění srdce. Jemné chemikálie a polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) se mohou izolovat z živočišných zdrojů, například z ryb, nebo z mikroorganismů. Kultivace mikroorganismů umožňuje produkovat a izolovat velká množství žádaných molekul.

Jakožto obzvláště vhodné mikroorganismy pro přípravu PUFA se uvádějí kmeny *Thraustochytria* nebo *Schizochytria*, řasy jako *Phaeodactylum tricorutum* nebo druhy *Cryptocodium*, *Ciliata* jako *Stylonychia* nebo *Colpidium*, houby jako *Mortierella*, *Entomophthora* nebo *Mucor*. Četné mutantní kmeny příslušných mikroorganismů, které produkují řadu žádaných sloučenin, včetně PUFA, byly vyvinuty selekcí kmenů. Touto selekcí kmenů za účelem zlepšení produkce určité molekuly je však časově náročná a obtížná operace. Nedostatkem je rovněž skutečnost, že se definovaným mikroorganizmem může produkovat pouze specifická nenasycená mastná kyselina nebo pouze specifické spektrum mastných kyselin.

Jemné chemikálie se také mohou vhodně vyrábět ve velkém měřítku prostřednictvím produkce rostlin, které se vyvíjely tak, že produkují shora uvedené PUFA. Jakožto rostliny zvláště vhodné k tomuto účelu se uvádějí olejniny, které obsahují velké množství lipidových sloučenin, jako jsou řepka olejka, kanna, len, soja, slunečnice, brtnákovité a pupalka dvouletá. Jsou však vhodné i jiné kulturní rostliny, které obsahují oleje nebo lipidy a mastné kyseliny, jak bude níže ještě podrobně uvedeno. Běžné pěstování rostlin vedlo k vývoji řady rostlinných mutantů, které produkují celé spektrum žádaných lipidů a

mastných kyselin, kofaktorů a enzymů. Avšak opět selekce nových variant rostlin se zlepšenou produkcí určité molekuly je časově náročný a obtížný proces nebo dokonce je nemožná, pokud se příslušná sloučenina přírodně v rostlině nevyskytuje, jak je tomu v případě polynenasycených mastných kyselin se 20 atomy uhlíku a mastných kyselin se 22 atomy uhlíku a mastných kyselin s delšími uhlíkovými řetězci.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je izolovaná nukleová kyselina odvozená z rostlin a z řas a kódující polypeptid, která elonguje mastné kyseliny se 16, 18 nebo 20 atomy uhlíku alespoň se dvěma dvojnými vazbami ve skeletu mastné kyseliny o alespoň dva atomy uhlíku.

Podstatou vynálezu je také genový konstrukt zahrnující izolovanou nukleovou kyselinu, přičemž je nukleová kyselina funkčně vázána na jeden nebo na několik regulačních signálů.

Podstatou vynálezu je také aminokyselinová sekvence, která se zakódovává izolovanou sekvencí nukleové kyseliny nebo genovým konstruktem.

Vynález se také týká mikroorganismu, který zahrnuje alespoň jednu nukleovou kyselinu, genový konstrukt nebo vektor podle vynálezu.

Vynález se také týká přípravy polynenasycených mastných kyselin PUFA a olejů, lipidů nebo mastných kyselin produkovaných tímto způsobem.

Vynález se také týká kitu, který obsahuje nukleovou kyselinu, genový konstrukt a další složky podle vynálezu.

Vynález se konečně také týká způsobu identifikace antagonistu nebo agonistu elongace podle vynálezu.

Vynález se tedy týká nových molekul nukleové kyseliny, které jsou vhodné pro identifikaci a izolaci elongázových genů PUFA biosyntézy a kterých lze použít pro modifikaci olejů, mastných kyselin, lipidů, sloučenin odvozených od lipidů a hlavně pro přípravu polynenasycených mastných kyselin, jelikož se jeví velká potřeba nových genů, které kódují enzymy, které se podílejí na biosyntéze nenasycených mastných kyselin a které umožňují jejich přípravu v průmyslovém měřítku. Zvláště jsou žádoucí enzymy pro biosyntézu mastných kyselin, které umožňují elongaci polynenasycených mastných kyselin, zvláště se dvěma nebo s několika dvojnými vazbami v molekule. Nukleové kyseliny podle vynálezu kódují enzymy, které mají tuto žádanou schopnost.

Mikroorganismy jako *Phaeodactylum*, *Colpidium*, *Mortierella*, *Entomophthora* nebo *Mucor*, *Crypthecodinium* a jiné řasy, houby a rostliny, zvláště kulturní olejnate rostliny se využívají obecně pro průmyslovou výrobu velkého množství jemných chemikálií v provozním měřítku.

Jsou k dispozici klonovací vektory a techniky pro genetickou manipulaci shora uvedených mikroorganismů a Ciliata (světový patentový spis WO 98/01572 a WO 00/23604) nebo řasy a podobné mikroorganismy jako *Phaeodactylum tricorutum*, které popsal Falciatore a kol. (*Marine Biotechnology* 1(3), str.239 až 251, 1999 a uvedená literatura) a Dunahay a kol. (*Genetic transformation of diatoms, J. Phycol.* 31, str. 1004 až 1012, 1995 a uvedená literatura). Molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu se mohou použít pro rekombinantní modifikace těchto organismů, takže se stávají lepšími a účinnějšími producery jedné nebo několika jemných chemikálií zvláště nenasycených mastných kyselin. Tato zlepšená produkce nebo účinnější pro-

dukce jemných chemikálií může být způsobena přímým působením nebo manipulací genu podle vynálezu nebo nepřímým působením takové manipulace.

Mechy a řasy jsou jedinými známými rostlinnými systémy, které produkují závažná množství polynenasycených mastných kyselin, jako jsou kyselina arašidová, (ARA) a/nebo eikosapentanová (EPA) a/nebo dokosahexanová (DHA) kyselina. Mechy obsahují PUFA v membránových lipidech, zatímco řasy, organizmy příbuzné řasám a některé houby také kumulují závažná množství PUFA v triacylglycerolové frakci. Molekuly nukleové kyseliny, které se izolují z takových kmenů, které také kumulují PUFA v triacylglycerolových frakcích, jsou zvláště vhodné pro modifikaci lipidů a PUFA produkčních systémů v hostitelích zvláště v mikroorganismech, jako jsou shora uvedené mikroorganismy, a v rostlinách, jako jsou olejnaté rostliny, například řepka olejka, canola, lněné semínko, soja, slunečnice, brutnákovité, rostliny produkující ricinový olej, olejová palma, safran (*Carthamus tinctorius*), kokos, podzemnice nebo kakaové boby. Nukleové kyseliny z mikroorganismů, kumulujících triacylglycerolovou frakci, se také mohou využít pro identifikaci takových sekvencí DNA a enzymů v jiných druzích, které jsou vhodné pro modifikaci biosyntézy PUFA prekurzorových molekul v příslušných organismech. Mikroorganismy, které kumulují PUFA, jako ARA, EPA a DHA v triacylglycerolech, jsou zvláště mikroorganismy jako *Cryptocodinium cohnii* a *Thraustochytrium species*. *Thraustochytria* jsou také těsně příbuzné s kmeny *Schizochytria* ve smyslu fylogenetiky. Právě ačkoliv tyto organizmy nejsou úzce příbuzné mechům, jako je *Physcomitrella*, sekvenční podobnosti DNA sekvence, zvláště polypeptidová hladina, se může pozorovat do té míry, že se molekuly DNA mohou identifikovat, izolovat a charakterizovat funkčně v heterologových hybridizačních pokusech, řazeních sekvencí a pokusech za použití polymerázových řetězových reakcí i z organismů, které jsou vzdáleně příbuzné z hlediska evoluce. Zvláště se mohou odvozovat kon-

senzní sekvence, které jsou vhodné pro heterologový skríníng nebo pro funkční komplementaci a predikci genových funkcí v třetích druzích. Shopnost identifikace takových funkcí, například k predikci substátové specificity enzymů, může mít proto velký význam. Kromě toho molekuly nukleové kyseliny mohou působit jako referenční sekvence pro mapování příbuzných genomů nebo pro odvozování PCR primerů.

Nové molekuly nukleové kyseliny kódují proteiny označované zde PUFA-specifické elongázy (PSE). Tyto PSE mohou například vyvíjet funkci, která se podílí na metabolismu (například na biosyntéze nebo na odbourání) sloučenin potřebných pro syntézu lipidu nebo mastné kyseliny, jako jsou PUFA, nebo se podílí na transmembránovém transportu jedné nebo několika kompozic lipid/mastná kyselina buď v buňce nebo mimo buňku.

Toto nové použití detailněji ukazuje izolaci takových nových elongázových genů. Nejdříve byly izolovány elongázové geny, které jsou vhodné pro produkci polynenasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem, mající více než 18 nebo 20 atomů uhlíku v uhlíkovém skeletu mastné kyseliny a/nebo alespoň dvě dvojně vazby v uhlíkovém řetězci, odvozované od typických organismů, které obsahují vysoké množství PUFA v triacylglycerolové frakci. To znamená buď PSE gen nebo PSE protein nebo PSE geny nebo PSE proteiny. Zveřejněné přihlášky vynálezu, patentové spisy a publikace nepopisují funkčně aktivní PSE gen, právě ačkoliv různé patentové spisy popisují elongaci nasycených mastných kyselin s krátkou nebo se střední délkou řetězce (světový patentový spis číslo WO 98/46776 a americký patentový spis číslo US 5 475099) nebo elongaci nebo produkci mastných kyselin s dlouhým řetězcem, které však nemají více než jednu dvojnou vazbu nebo vedou k voskovým esterům mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (světový patentový spis číslo WO 98/54954, WO 96/13582, WO 95/15387). Vynález se týká izolace nových elongáz s novými vlastnostmi. Jestliže se vychází ze sekvence

v SEQ ID NO:1, je možné nalézt nové nukleové kyseliny, které kódují elongázy, které elongují nenasycené mastné kyseliny.

Světové patentové spisy WO 99/64616, WO 98/46763, WO 98/46764, WO 98/46765 popisují produkci PUFA v transgenových rostlinách a demonstrují klonování a funkční expresi odpovídajících desaturázových aktivit, zvláště z hub, nedemonstrují však PSE kódující gen a žádné funkční PSE aktivity. Exprese desaturázových aktivit vede k posunu ve spektru mastných kyselin v transgenových rostlinách, nepozoruje se však žádné zvýšení obsahu nenasycených mastných kyselin. Produkce trienové kyseliny s 18 atomy uhlíku byla demonstrována a nárokována se zřetelem na gama-linolenovou kyselinu avšak produkce polynenasycených mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem (se 20 atomy uhlíku a s delším uhlíkovým řetězcem a trienových kyselin a vyšších nenasycených typů) až dosud demonstrována nebyla.

Pro přípravu PUFA s dlouhým řetězcem se musí polynenasycené mastné kyseliny s 16 nebo s 18 atomy uhlíku elongovat o alespoň dva atomy uhlíku enzymatickou aktivitou elongázy. Nukleová kyselinová sekvence SEQ ID NO:1 podle vynálezu kóduje první rostlinnou elongázu, která je schopná elongovat mastné kyseliny s 16 nebo s 18 atomy uhlíku s alespoň dvěma dvojnými vazbami ve skeletu kyseliny o alespoň dva atomy uhlíku. Po elongačním cyklu vede tato enzymová aktivita k mastným kyselinám se 20 atomy uhlíku a po dvou, třech a čtyřech cyklech elongace k mastným kyselinám se 22, 24, nebo 26 atomy uhlíku. Mohou se také syntetizovat PUFA s delším řetězcem pomocí jiných elongáz, kterých se vynález týká (SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11). Tyto elongázy se mohou používat jednotlivě, násobně nebo například v adici k PUFA elongáze z mechu *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO:1) pro zvýšení obsahu PUFA při novém způsobu přípravy PUFA. Aktivita elongáz podle vynálezu vede s výhodou k mastným kyselinám se 20 atomy uhlíku s alespoň dvěma dvojnými vazbami v molekule

mastné kyseliny, s výhodou se třemi nebo čtyřmi dvojnými vazbami, zvláště s výhodou se třemi dvojnými vazbami v molekule mastné kyseliny a/nebo vede k mastným kyselinám se 22 atomy uhlíku s alespoň dvěma dvojnými vazbami v molekule mastné kyseliny, s výhodou se čtyřmi, pěti nebo šesti dvojnými vazbami, zvláště s výhodou s pěti nebo šesti dvojnými vazbami v molekule mastné kyseliny. Když proběhne elongace enzymem podle vynálezu, mohou se provádět další desaturační stupně k získání mastných kyselin s vysokou nenasyceností. Produkty elongázové aktivity a další desaturace, která je možná, vedou k výhodným PUFA s vyšším stupněm desaturace, jako jsou kyselina dokosadienová, arašidonová, omega6-eikosatriendihomo-gama linolenová, eikosapentaenová, omega3-eikosatrienová, omega3-eikosatetraenová, dokosapentaenová nebo dokosahexaenová kyselina. Jako substráty enzymové aktivity podle vynálezu se uvádějí příkladně kyselina taxolová, 7,10,13-hexadekatrienová, 6,9-oktadekadienová, linolová, linolenová, α -linolenová nebo gama-linolenová nebo stearidonová kyselina avšak také kyselina arašidonová, eikosatetraenová, dokosapentaenová a eikosapentaenová kyselina. Výhodnými substráty jsou kyselina linolová, a/nebo gama-linolenová a/nebo α -linolenová kyselina avšak také kyselina arašidonová, eikosatetraenová, dokosapentaenová a eikosapentaenová kyselina. Obzvláště výhodnými jsou kyselina arašidonová, dokosapentaenová a eikosapentaenová kyselina. Mastné kyseliny se 16 nebo 18 atomy uhlíku s alespoň dvěma dvojnými vazbami ve skeletu mastné kyseliny se mohou elongovat enzymatickou aktivitou podle vynálezu ve formě volné mastné kyseliny nebo ve formě esterů, jako jsou fosfolipidy, glykolipidy, sfingolipidy, fosfoglyceridy, monoacylglycerol, diacylglycerol nebo triacylglycerol. Zvláštní význam pro výživu lidí má konjugovaná linolová kyselina "CLA". Označením CLA se míní zvláště mastné kyseliny jako C18:2^{9cis,11trans} nebo isomer C18:2^{10trans,12cis}, který se může desaturovat nebo elongovat po absorpci tělem díky lidskému enzymovému systému a může přispívat k podpoře zdraví. Elongázy podle vynálezu umožňují také elongaci těchto

konjugovaných mastných kyselin, které mají alespoň jednu dvojnou vazbu v molekule a tak činit dostupnými takové zdraví podporující mastné kyseliny pro lidskou výživu. Jakožto další příklady konjugovaných mastných kyselin se uvádějí kyselina α -parinarová, eleostearová a kalendulová kyselina.

Klónováním vektorů pro použití v rostlinách a v transformaci rostlin, známým z literatury (Plant Molecular Biology and Biotechnology [CRC press, Boca Raton, Florida], kapitola 6/7, str. 71 až 119, 1993; F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants, Transgenic Plants, sv. 1, Engineering and Utilization, vyd. Kung a R. Wu, Academic Press, str. 15 až 38, 1993; B. Jené a kol., Techniques for Gene Transfer, Transgenic Plants, sv. 1, Engineering and Utilization, vyd. Kung a R. Wu, Academic Press, str. 128 až 143, 1993; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42, str. 205 až 225, 1991) se mohou použít nukleové kyseliny podle vynálezu pro rekombinantní modifikace širokého spektra rostlin takže se stanou lepšími, účinnějšími nebo modifikovanými producery jednoho nebo několika produktů odvozených od lipidů, například PUFA. Tato zlepšená produkce nebo produkční účinnost produktu odvozeného od lipidů, jako PUFA může být způsobena přímým působením manipulace nebo nepřímým působením této manipulace.

Je známa řada mechanismů, kterými modifikace PSE proteinu podle vynálezu může přímo ovlivnit výtěžek, produkci a/nebo produkční účinnost jemné chemikálie z olejnin nebo z mikroorganismů se zřetelem na modifikovaný protein. Počet nebo aktivita PSE proteinu nebo PSE genu se může zvýšit, takže se produkuje větší množství těchto sloučenin de novo, jelikož organizmy nemají tuto aktivitu a schopnost biosyntézy před zavedením příslušného genu. Rovněž použití různých divergentních sekvencí, to je sekvencí, které se liší od DNA sekvencí hlady, mohou být výhodné v této souvislosti.

Zavádění PSE genu nebo plurality PSE genů do organizmu nebo do buňky může nejen zvýšit biosyntézní pochod k získání konečného produktu, může však také zvýšit nebo vytvořit de novo odpovídající triacylglycerolovou kompozici. Rovněž počet nebo aktivita jiných genů, které jsou zahrnuty v dodání živin potřebných pro biosyntézu jedné nebo několika jemných chemikálií (například mastných kyselin, polárních nebo neutrálních lipidů), se může zvýšit, takže koncentrace těchto prekurzorů, kofaktorů nebo meziproductů se zvýší v buňkách nebo ve skladovacích orgánech, takže se dále zvýší schopnost buněk produkovat PUFA, jak se níže vysvětlí. Mastné kyseliny a lipidy jsou jako takové žádoucími jemnými chemikáliemi; optimalizace aktivity nebo zvýšení počtu jedné nebo několika PSE, které jsou zahrnuty v biosyntéze těchto sloučenin nebo destrukce aktivity jedné nebo několika PSE, které jsou zahrnuty v odbourání těchto sloučenin, mohou umožňovat zvýšení výtěžku, produkce a/nebo produkční účinnosti molekul mastných kyselin a molekul lipidů z rostlin nebo z mikroorganismů.

Mutageneze PSE genu podle vynálezu může vést také k PSE proteinu, který modifikuje aktivity, které přímo nebo nepřímo ovlivňují produkci jedné nebo několika žádaných jemných chemikálií. Například počet nebo aktivita PSE genu podle vynálezu se může zvýšit, takže normální metabolické odpadní produkty nebo vedlejší produkty buňky (jejichž množství se může zvýšit se zřetelem na nadprodukcii žádané jemné chemikálie) se převede účinným způsobem před destrukcí jiných molekul nebo procesů v buňce (což by snižovalo buněčnou životnost) nebo by narušovalo biosyntézní pochod jemné chemikálie (a tak snižovalo výtěžek, produkci nebo produkční účinnost žádané jemné chemikálie). Kromě toho poměrně velká intracelulární množství žádané jemné chemikálie jako takové mohou být pro buňku toxická nebo mohou interferovat s enzymatickým mechanismem zpětné vazby, jako je allosterická regulace; například by mohla zvyšovat alokaci PUFA do triacylglycerolové frakce se zřetelem na zvý-

šenou aktivitu nebo počet jiných enzymů nebo detoxifikaci enzymů v následující cestě PUFA; životnost buněk semen se může zvýšit, což vede k lepšímu vývoji buněk v kultuře nebo v semenech, která produkují žádanou jemnou chemikálii. Nebo se PSE gen podle vynálezu může manipulovat tak, že se produkují odpovídající množství různých lipidových molekul a molekul mastných kyselin. To může mít rozhodující vliv na složení lipidu buněčné membrány a generovat nové oleje vedle PUFA, které se syntetizují de novo. Jelikož má každý typ lipidů odlišné fyzikální vlastnosti, změna složení lipidů membrány podstatně modifikuje membránovou fluiditu. Změny membránové fluidity mohou mít vliv na transport molekul membránou a na integritu buňky, což opět má rozhodující vliv na produkci jemných chemikálií. I v rostlinách mohou tyto změny mít také vliv na jiné vlastnosti, jako jsou tolerance k abiotickým a biotickým stresovým situacím.

Biotická a abiotická stresová tolerance je obecná vlastnost, kterou je žádoucí vnést do širokého spektra rostlin, jako jsou kukuřice, pšenice, žito, oves, triticales, rýže, ječmen, soja, podzemnice, bavlník, řepka olejka a canola, maniok, pepř, slunečnice a aksamitník, rostliny Solanaceae jako brambory, tabák, lilek a rajče, *Vicia species*, hrách, vojtěška, keřovité rostliny (kávovník, kakaovník, čajovník), *Salix species*, stromy (olejová palma, kokosová palma), víceleté trávy a píče. Podle vynálezu jsou tyto rostliny také výhodnými cílovými rostlinami pro genetické inženýrství. Obzvláště výhodnými rostlinami pro účely vynálezu jsou olejniny jako soja, podzemnice, řepka olejka, canola, slunečnice, světlice, stromy (olejová palma, kokosová palma), nebo obilniny jako kukuřice, pšenice, žito, oves, triticales, rýže, ječmen, vojtěška nebo keřovité rostliny (kávovník, kakaovník, čajovník).

Vynález se také týká izolovaných molekul nukleové kyseliny (například cDNA) obsahujících nukleotidové sekvence, které

18.07.02

kódují PSE nebo některé PSE nebo jejich biologicky aktivní části, nebo fragmenty nukleové kyseliny, které jsou vhodné jako primery nebo hybridizační sondy pro detekci nebo zesílení PSE kódujících nukleových kyselin (například DNA nebo mRNA). Podle zvláště výhodného provedení molekula nukleové kyseliny zahrnuje jednu z nukleotidových sekvencí ze souboru zahrnujícího: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11 nebo kódující region nebo komplement jedné z těchto nukleotidových sekvencí. Podle jiného výhodného provedení izolovaná molekula nukleové kyseliny podle vynálezu zahrnuje nukleotidovou sekvenci, která hybridizuje s nukleotidovou sekvencí ze souboru zahrnujícího: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11 nebo s její částí nebo která má s ní alespoň přibližně 50%, s výhodou alespoň přibližně 60%, ještě výhodněji alespoň přibližně 70%, 80% nebo 90% a ještě výhodněji alespoň přibližně 95%, 96%, 97%, 98%, 99% nebo vyšší homologii. Podle jiného výhodného provedení izolovaná molekula nukleové kyseliny kóduje jednu aminokyselinovou sekvenci ze souboru zahrnujícího: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12. S výhodou výhodný PSE gen podle vynálezu má také alespoň jednu PSE zde popisovanou aktivitu.

Podle dalšího provedení vynálezu kóduje izolovaná molekula nukleové kyseliny protein nebo jeho část, protein nebo jeho část obsahující aminokyselinovou sekvenci, která má dostatečnou homologii s aminokyselinovou sekvencí ze souboru zahrnujícího: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12, přičemž si protein nebo jeho část uchovává PSE aktivitu. S výhodou protein nebo jeho část, který je kódován molekulou nukleové kyseliny, si podržuje schopnost podílet se na metabolismu žádaných sloučenin pro syntézu buněčných membrán rostlin nebo na transportu molekul touto membránou. Podle jednoho provedení vynálezu má protein, kódovaný molekulou nukleové kyseliny, alespoň přibližně 50%,

s výhodou alespoň přibližně 60%, ještě výhodněji alespoň přibližně 70%, 80% nebo 90% a ještě výhodněji alespoň přibližně 95%, 96%, 97%, 98%, 99% nebo vyšší homologii s aminokyselinovou sekvencí ze souboru zahrnujícího: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12. Podle dalšího výhodného provedení je proteinem protein s plnou délkou, jehož část je v podstatě homologická s kompletní aminokyselinovou sekvencí ze souboru zahrnujícího: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12 (která je v důsledku otevřeného čtecího rámce ukázána v sekvenci ze souboru zahrnujícího: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11) a která se může izolovat v plné délce způsobem a pokusy běžnými pro pracovníky v oboru.

Podle jiného provedení izolovaná molekula nukleové kyseliny pochází z *Phytophthora infestans*, z *Physcomitrella patens*, z *Cryptothecodinium cohnii* nebo z *Thraustochytria* a kóduje protein (například PSE fuzní protein) obsahující biologicky aktivní doménu, která má alespoň 50% nebo vyšší homologii s aminokyselinovou sekvencí sekvence SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12 a ponechává si schopnost podílet se na metabolismu žádaných sloučenin pro syntézu buněčných membrán rostlin nebo na transportu molekul touto membránou, nebo která má alespoň jednu elongační aktivitu vedoucí k PUFA, jako jsou ARA, EPA nebo DHA nebo jejich prekursorové molekuly nebo jednu z aktivit uvedených v tabulce I, a zahrnuje také heterologové sekvence nukleové kyseliny, které kódují heterologový polypeptid nebo regulační proteiny.

sem dočteno

V tabulce je profil mastných kyselin pěti transgenových kvasnicových kmenů v mol procentech. Podíly přidané a absorbované gama linolenové kyseliny jsou zdůrazněny tučným vytištěním, elongované produkty jsou podtrženy a elongovaná kyseliny gama-linolenová je zdůrazněna vytištěním tučně (poslední řádek.

Mastné kyseliny [mol%]	pYES2	pY2PSE1a	pY2PSE1b	pY2PSE1c	pY2PSE1d
16:0	17,0	17,6	16,4	16,3	17,6
16:1 Δ^9	28,0	26,8	28,0	27,9	25,1
18:0	6,5	6,0	6,4	5,6	6,1
18:1 Δ^9	25,9	23,5	27,0	25,2	21,4
18:3 $\Delta^{6,9,12}$	22,6	15,7	13,2	16,4	22,8
20:3 $\Delta^{8,11,14}$	-	10,3	9,0	8,6	7,1
18:3 $\Delta^{6,9,12}$ - Elongase	-	39,6	40,5	34,4	23,7

Podle jiného provedení má izolovaná molekula nukleové kyseliny alespoň 15 nukleotidů ve své délce a hybridizuje za přísných podmínek s molekulou nukleové kyseliny obsahující nukleotidovou sekvenci SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SWQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11. Izolovaná molekula nukleové kyseliny odpovídá s výhodou přírodně se vyskytující molekule nukleové kyseliny. Ještě výhodněji kóduje izolovaná molekula nukleové kyseliny přírodně se vyskytující Crypthecodinium, Phytophthora nebo Thraustochytrium PSE nebo jejich biologicky aktivní podíl.

Vynález se také týká vektorů, například rekombinantních expresních vektorů, obsahujících alespoň jednu nukleotidovou molekulu podle vynálezu a hostitelské buňky, do kterých jsou tyto vektory zavedeny, zvláště mikroorganismy, rostlinné buňky, rostlinné tkáně, rostlinné orgány nebo nedotčené rostliny. Podle jednoho provedení vynálezu může hostitelská buňka ukládat jemné chemikálie, zvláště PUFA; k izolaci žádané sloučeniny se buňky sklídí. Sloučeniny (oleje, lipidy, triacylglyceridy, mastné kyseliny) nebo PSE se mohou izolovat z prostředí nebo z hostitelské buňky, kterými v případě rostlin, jsou buňky obsahující nebo skladující jemné chemikálie, nejvýhodněji buňky skladujících tkání, jako jsou semenné obaly, hlízy, epidermové buňky a semenné buňky.

Vynález se také týká geneticky modifikovaných rostlin,

s výhodou shora uvedených olejin, zvláště řepky olejky, lněného semínka nebo rostliny *Physcomitrella patens*, do kterých byl zaveden PSE gen. Podle jednoho provedení genom řepky olejky, lněného semínka nebo rostliny *Physcomitrella patens* je modifikován zavedením jakožto transgenu molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu kódující divoký typ nebo mutovanou PSE sekvenci. Podle jiného provedení vynálezu se modifikuje endogenní PSE gen v genomu donorového organismu *Physcomitrella patens*, *Phytophthora infestans*, *Cryptosporidium* nebo *Thraustochytrium*, takže se funkčně naruší, například homologovou rekombinací s modifikovaným PSE genem nebo mutagenézí a detekcí DNA sekvencemi. Podle výhodného provedení rostlinný organismus patří do rodu *Physcomitrella*, *Ceratodon*, *Funaria*, řepka olejka nebo lněné semínko, přičemž jsou výhodnými *Physcomitrella*, řepka olejka nebo lněné semínko. Podle výhodného provedení vynálezu se *Physcomitrella*, řepka olejka nebo lněné semínko také používá k produkci žádané sloučeniny, jako jsou lipidy nebo mastné kyseliny, přičemž se PUFA uvádějí jakožto zvláště výhodné.

Podle dalšího výhodného provedení se mechu *Physcomitrella patens* může používat pro demonstraci funkce elongázového genu za použití homologové rekombinace na bázi zde popisovaných nukleových kyselin.

Vynález se rovněž týká izolovaného PSE genu nebo jeho části například jeho biologicky aktivní části. Podle výhodného provedení izolovaný PSE nebo jeho část se mohou podílet na metabolismu žádaných sloučenin pro syntézu buněčných membrán v mikroorganismu nebo v rostlinné buňce nebo na transportu molekul jejich membránami. Podle dalšího výhodného provedení vynálezu izolovaný PSE nebo jeho část má dostatečnou homologii s aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12 pro tento protein nebo jeho část k udržení schopnosti podílet se na metabo-

lizmu sloučenin potřebných pro syntézu buněčných membrán v mikroorganismech a v rostlinných buňkách nebo na transportu molekul jejich membránami.

Vynález se také týká izolovaných preparací PSE. Podle výhodného provedení zahrnuje PSE gen aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12. Podle dalšího výhodného provedení se vynález týká izolovaného proteinu v plné délce, který je v podstatě homologový s kompletní aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12 (které se kódují otevřenými čtecími rámci v SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11. Podle dalšího provedení vynálezu má protein alespoň přibližně 50%, s výhodou alespoň přibližně 60%, ještě výhodněji alespoň přibližně 70%, 80% nebo 90% a ještě výhodněji alespoň přibližně 95%, 96%, 97%, 98%, 99% nebo vyšší homologii s aminokyselinovou sekvencí ze souboru zahrnujícího: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12. Podle dalšího výhodného provedení vynálezu izolovaný PSE zahrnuje aminokyselinovou sekvenci, která má alespoň 50% homologii s aminokyselinovou sekvencí ze souboru zahrnujícího: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12 a která se může podílet na metabolismu žádaných sloučenin pro syntézu mastných kyselin v mikroorganismech a v rostlinné buňce nebo na transportu molekul jejich membránami nebo má alespoň jednu elongační aktivitu pro PUFA, přičemž se elongace s výhodou zaměřuje na desaturované řetězce se 16 nebo 18 nebo 20 atomy uhlíku se dvojnými vazbami alespoň ve dvou polohách.

Nebo může izolovaný PSE zahrnovat aminokyselinovou sekvenci která se kóduje nukleotidovou sekvencí hybridizující s nukleotidovou sekvencí SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11 například za

přísných podmínek nebo která má s ní alespoň přibližně 50%, s výhodou alespoň přibližně 60%, ještě výhodněji alespoň přibližně 70%, 80% nebo 90% a ještě výhodněji alespoň přibližně 95%, 96%, 97%, 98%, 99% nebo vyšší homologii. Je také výhodné pro výhodné PSE formy, aby měly shora popsané PSE aktivity.

PSE polypeptid nebo jeho biologicky aktivní část se může funkčně vázat na ne-PSE polypeptid za vytvoření fúzního proteinu. Podle výhodného provedení má tento fúzní protein aktivitu, která se liší od samotného PSE. Podle jiného výhodného provedení se tento fúzní protein podílí na metabolismu sloučenin, které jsou potřebné pro syntézu lipidů a mastných kyselin, kofaktorů a enzymů v mikroorganismech a v rostlinách nebo na transportu molekul těmito membránami. Podle zvláště výhodných provedení moduluje zavedení tohoto fúzního proteinu do hostitelské buňky produkci žádané sloučeniny buňkou. Podle výhodného provedení mohou tyto fúzní proteiny také obsahovat $\Delta 4-$, $\Delta 5-$, nebo $\Delta 6-$, $\Delta 8-$, $\Delta 15-$, $\Delta 17-$ nebo $\Delta 19-$ desaturázové aktivity samotné nebo v kombinaci.

Vynález se také týká způsobu produkce jemných chemikálií. Tento způsob je založen buď na kultivaci vhodných mikroorganismů nebo na kultivaci rostlinných buněk, rostlinných tkání, rostlinných orgánů nebo neporušených rostlin zahrnujících nukleotidovou sekvenci SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11 nebo jejich homology, deriváty nebo analogy nebo genový konstrukt, který zahrnuje sekvenci SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11 nebo jejich homology, deriváty nebo analogy nebo vektor obsahující tyto sekvence nebo genový konstrukt, který se podílí na expresi PSE molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu, takže se produkují jemné chemikálie. Podle výhodného provedení zahrnuje způsob stupeň získání buňky obsahující takovou sekvenci elongázové nukleové kyseliny podle vynálezu, přičemž je buňka transformována sekvencí elongázové

nukleové kyseliny, genovým konstruktem nebo vektorem, přičemž dochází k expresi PSE nukleové kyseliny podle vynálezu. Podle dalšího provedení zahrnuje tento proces dále stupeň získání jemné chemikálie z kultury. Podle zvláště výhodného provedení spadá buňka do řádu Ciliata, mikroorganismů, jako jsou houby, nebo rostlin, zvláště olejnin, přičemž mikroorganismy a olejnininy jsou zvláště výhodné.

Vynález se také týká způsobu modulace produkce molekuly mikroorganizmem. Tyto způsoby zahrnují kombinaci buňky se substancí, která moduluje PSE aktivity nebo expresi PSE nukleové kyseliny, takže se s buňkou spojená aktivita modifikuje se zřetelem na stejnou aktivitu v nepřítomnosti takové substance. Podle výhodného provedení metabolická cesta nebo dvě metabolické cesty buňky pro lipidy a mastné kyseliny, kofaktory a enzymy je nebo jsou meodulovány nebo transport sloučenin těmito membránami je modulován tak, že se tímto mikroorganizmem zlepší výtěžek nebo produkční rychlost žádané jemné chemikálie. Substancí, která moduluje PSE aktivitu, může být substance, která stimuluje PSE aktivitu nebo expresi PSE nukleové kyseliny nebo která se může používat jako meziproduct v biosyntéze mastné kyseliny. Jakožto příklady substancí, které stimuluji PSE aktivitu nebo expresi PSE nukleových kyselin se například uvádějí malé molekuly, aktivní PSE a nukleové kyseliny kódující PSE, které se zavedou do buňky. Jakožto příklady substancí, které inhibují PSE aktivitu nebo PSE expresi se uvádějí malé molekuly a/nebo antimediatorové PSE modulované nukleové kyseliny.

Vynález se také týká způsobu modulace výtěžku žádané sloučeniny z buňky, která zahrnuje zavedení do buňky divokého typu nebo mutantu PSE genu, který je buď držen na separovaném plasmidu nebo je integrován do genomu hostitelské buňky. V případě integrace do genomu, může být integrace náhodná nebo k ní dochází rekombinací, takže se nativní gen nahradí kopií, která

se zavádí za modulování produkce žádané sloučeniny buňkou nebo za použití genového intronu, takže se gen funkčně váže na funkční expresní jednotku obsahující alespoň jednu sekvenci, která zajišťuje expresi genu a alespoň jednu sekvenci, která zajišťuje polyadenylaci funkčnosti transkribovaného genu.

Podle výhodného provedení se modifikuje výtěžek. Podle dalšího provedení se zvyšuje výtěžek žádané chemikálie za snížení výtěžku nežádoucích sloučenin, které mohou mít negativní působení. Podle zvláště výhodného provedení je žádanou jemnou chemikálií lipid nebo mastná kyselina, kofaktor nebo enzym. Podle obzvláště výhodného provedení vynálezu je touto chemikálií polynenasycená mastná kyselina především ze souboru zahrnujícího arašidonovou kyselinu (ARA), eikosapentaenovou kyselinu (EPA) nebo dokosahexaenovou kyselinu (DHA).

Vynález blíže obsahuje následující podrobný popis.

Vynález se týká PSE nukleových kyselin a PSE proteinových molekul, které se podílejí na metabolismu lipidů a mastných kyselin, PUFA, kofaktorů a enzymů mechu *Physcomitrella patens*, *Phytophthora infestans*, *Crypthecodinium* nebo *Thraustochytrium* nebo na transportu lipofilních sloučenin membránami. Sloučeniny podle vynálezu se mohou používat pro modulaci produkce jemných chemikálií z organismů, například z mikroorganismů, jako jsou ciliates, houby, kvasinky, bakterie, řasy a/nebo z rostlin, jako jsou kukuřice, pšenice, žito, oves, triticales, rýže, ječmen, soja, podzemnice, bavlník, druhy *Brassica*, jako jsou řepka olejka, canola a tuřín, pepř, slunečnice, brutnák lékařský, pupalka dvouletá a aksamitník, rostliny *Solanaceae* jako jsou brambory, tabák, lilek a rajče, *Vicia species*, hrách, casava, vojtěška, z keřovitých rostlin (káva, kakao, čaj), *Salix species*, ze stromů (olejová palma, kokosová palma) a z trvalé trávy a z píce buď přímo (například v případě, kdy nadexpresí nebo optimalizací biosyntézy mastné kyseliny se

protein přímo podílí na výtěžku, produkci a/nebo produkční účinnosti mastné kyseliny z modifikovaných organismů), nebo mohou mít nepřímý vliv, který nicméně vede ke zvýšení výtěžku, produkce a/nebo produkční účinnosti žádané sloučeniny nebo k poklesu nežádaných sloučenin (například v případě, když modulace lipidu nebo mastné kyseliny, kofaktoru a enzymového metabolismu vede ke změně výtěžku, produkce a/nebo produkční účinnosti nebo složení žádaných sloučenin v buňkách, což má opět vliv na produkci jedné nebo několika jemných chemikálií). Jednotlivá hlediska vynálezu jsou následně podrobněji vysvětlena.

I. Jemné chemikálie a PUFA

Výraz "jemné chemikálie" je v oboru znám a zahrnuje molekuly, které se mají produkovat organismem a kterých se používá v různých průmyslových odvětvích, jako jsou například, tedy bez záměru na jakémkoliv omezení, průmysl farmaceutický, zemědělský, potravinářský a kosmetický. Tyto sloučeniny zahrnují například lipidy, mastné kyseliny, kofaktory a enzymy (jak popisuje například Kuninaka A., *Nucleotides and related compounds*, str. 561 až 612, *Biotechnology*, svazek 6, 1996, Rehm a kol., vyd.: VCH Weinheim a připojené citace), lipidy, nasycené a nenasycené mastné kyseliny (například arašidonová kyselina), vitaminy a kofaktory (*Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, svazek A27, *Vitamins*, str. 443 až 613, 1996: VCH Weinheim a připojené citace); a Ong A.S., Niki E. & Packer L. (1995) *Nutrition, Lipids, Health and Disease Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for free radical Research - Asia*, 1 až 3 září 1994, Penang, Malaysia, AOCs Press (1995), enzymy a všechny jiné chemikálie, které popsal Gutcho (*Chemicals by Fermentation*, 1983, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086 a připojené citace). Metabolismus a použití určitých jemných chemikálií jsou následně blíže objasněny.

Kombinace různých prekursorových molekul a biosyntézních enzymů vede k produkci různých molekul mastných kyselin, které mají rozhodující vliv na složení membrány. Je možno konstatovat, že PUFA se nejen začleňují do triacylglycerolu, avšak také do membránových lipidů.

Syntéze membrány je dobře charakterizovaný proces, ve kterém je zahrnut počet složek včetně lipidů jakožto část dvouvrstvé membrány. Produkce nových mastných kyselin jako PUFA, může proto generovat nové vlastnosti membránových funkcí uvnitř buňky nebo organismu.

Buněčné membrány mají nejrůznější funkce v buňce. Především a nejvíce membrána delimituje obsahy buňky z okolí a tak dodává buňce integritu. Membrány také mohou působit jako bariéry proti vlivu nebezpečných a nežádoucích sloučenin nebo proti ztrátě žádaných sloučenin.

Podrobně popsali membrány a jejich působení Bamberg a kol., Charge transport of ion pumps on lipid bilayer membranes, Q. Rev. Biophys 26, str. 1 až 26, 1993; Gennis R.B., Pores, Channels and Transporters, Biomembranes, Molecular Structure and Function, Springer, Heidelberg, str. 270 až 322, 1989; a Nikaído H. a Saier H., Transport proteins in bacteria: common themes in their design, Science 258, str. 936 až 942, 1992; a citace v uvedených publikacích.

Syntéza lipidů se může rozdělit na dvě části: syntéza mastných kyselin a jejich vázání na sn-glycerol-3-fosfát a adice nebo modifikace polární hlavové skupiny. Zpravidla lipidy, používané v membránách, zahrnují fosfolipidy, glykolipidy, sphingolipidy a fosfoglyceridy. Syntéza mastných kyselin začíná konverzí acetyl-coa buď na malonyl-CoA acetylCoA karboxylázou nebo acetyl-ACP acetyltransacylázou. Po kondenzační reakci tyto dvě produktové molekuly spolu vytvářejí acetoacetyl-ACP,

který se převádí řadou kondenzačních, redukčních a dehydratačních reakcí na molekulu nasycené mastné kyseliny s žádanou délkou řetězce. Produkce nenasycených mastných kyselin z těchto molekul se katalyzuje specifickými desaturázami buď aerobicky molekulárním kyslíkem nebo anaerobicky (syntéza mastných kyselin v mikroorganismech: F.C. Neidhardt a kol., *E. coli* and *Salmonella*. ASM Press, Washington, D.C., str. 612 až 636, 1996 a připojená literatura; Lengeler a kol., (vyd.) *Biology of procaryotes*. Thieme, Stuttgart, New York, 1999 a připojená literatura; a Magniuson K. a kol., *Microbiological Reviews* 57, str. 522 až 542, 1993 a připojená literatura).

Jakožto příklady prekursorů pro PUFA biosyntézu se uvádějí linolová a linolenová kyselina. Tyto mastné kyseliny s 18 atomy uhlíku musejí být elongovány na 20 nebo 22 atomů uhlíku k získání mastných kyselin s řetězcem typu eikosa a dokosa.

Různé desaturázy jako enzymy, mající $\Delta 6$ -desaturázovou, $\Delta 5$ -desaturázovou a $\Delta 4$ -desaturázovou aktivitu, mohou vést ke kyselině arašidonové, eikosapentaenové a dokosahexaenové a různé jiné PUFA s dlouhým řetězcem se mohou extrahovat a používat pro různé účely v potravinářství jako potrava a v kosmetickém a ve farmaceutickém průmyslu.

Pro produkci PUFA s dlouhým řetězcem se polynenasycené mastné kyseliny se 16, 18 nebo 20 atomy uhlíku musí, jak shora uvedeno, elongovat alespoň o dva atomy uhlíku enzymatickou aktivitou elongáz. Sekvence nukleové kyseliny podle vynálezu kódují první mikrobiální elongázy z typických producentů obsahujících PUFA v triacylglycerolové frakci, přičemž elongázy jsou schopné elongovat mastné kyseliny s 16 nebo s 18 nebo se 20 atomy uhlíku s alespoň dvěma dvojnými vazbami na mastné kyseliny o alespoň dva atomy uhlíku, nebo které je mohou konvertovat například sekvenciálně v následnosti převáděním mastné kyseliny s 16 nebo s 18 atomy uhlíku na mastnou kyselinu se 20

atomy uhlíku a pak mastnou kyselinu se 20 atomy uhlíku na mastnou kyselinu se 22 nebo s vyšším počtem atomů uhlíku obsahující jednotky se 2 atomy uhlíku. Po jednom elongačním cyklu tato enzymová aktivita vede k mastným kyselinám se 20 atomy uhlíku, po dvou, třech a čtyřech elongačních cyklech k mastným kyselinám se 22, 24 nebo 26 atomy uhlíku. Delší PUFA se rovněž mohou syntetizovat za použití elongáz podle vynálezu. Aktivita elongáz podle vynálezu s výhodou vede k mastným kyselinám se 20 a/nebo 22 atomy uhlíku s alespoň dvěma dvojnými vazbami v molekule mastné kyseliny, k mastným kyselinám se 20 atomy uhlíku s výhodou se třemi, čtyřmi nebo pěti dvojnými vazbami, zvláště s výhodou se třemi dvojnými vazbami v molekule mastné kyseliny, k mastným kyselinám se 22 atomy uhlíku s výhodou se třemi, čtyřmi, pěti nebo šesti dvojnými vazbami, zvláště s výhodou se pěti nebo šesti dvojnými vazbami v molekule mastné kyseliny. Po elongaci enzymem podle vynálezu se mohou provádět další desaturační stupně. Proto produkty elongázových aktivit a další desaturace mohou vést k výhodným PUFA s vyšším stupněm desaturace, jako jsou kyselina dokosadienová, arašidonová, ω 6-eikosatriendihomo-gama-linolenová, eikosapentaenová, ω 3-eikosatrienová, ω 3-eikosatetraenová, dokosapentaenová nebo dokosahexaenová kyselina. Jakožto příklady substrátů enzymové aktivity podle vynálezu se uvádějí kyselina taxolová, 7,10,13-hexadekatrienová, 6,9-oktadekadienová, linolová, gama-linolenová, linolenová, α -linolenová, arašidonová, eikosapentaenová nebo stearidonová kyselina. Výhodnými substráty jsou kyselina linolová, gama-linolenová, a/nebo α -linolenová nebo arašidonová, eikosatetraenová nebo eikosapentaenová kyselina. Mastné kyseliny se 16 nebo s 18 nebo se 20 atomy uhlíku, které mají alespoň dvě dvojně vazby v molekule mastné kyseliny se mohou elongovat enzymovou aktivitou podle vynálezu nebo ve formě esteru, jako jsou fosfolipidy, glykolipidy, sfingolipidy, fosfoglyceridy, monoacylglycerol, diacylglycerol nebo triacylglycerol.

Mastné kyseliny musejí být následně transportovány na různé lokace a včleněny do triacylglycerolového zásobního lipidu. Jiným důležitým stupněm v syntéze lipidů je transfer mastných kyselin do polárních hlavových skupin, například acyltransferázou glycerolmastné kyseliny (Frentzen, Lipid 100 (4-5), str. 161 až 166, 1998).

Existuje četná literatura týkající se biosyntézy rostlinných mastných kyselin, desaturace, lipidového metabolismu a transportu mastných sloučenin membránou, β -oxidace, modifikace mastné kyseliny a kofaktorů, skladování triacylglycerolu a souborů včetně ještě v takové literatuře připomínaných odkazů (Kinney, Genetic Engineering, vyd. JK Setlow, 19, str. 149 až 166, 1997; Ohlrogge a Browse, Plant Cell 7, str. 957 až 970, 1995; Shanklin a Cahoon, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49, str. 611 až 641, 1998; Voelker, Genetic Engineering, vyd. JK Setlow, 18, str. 111 až 113, 1996; Gerhardt, Progr. Lipid Res. 31, str. 397 až 417, 1992; Gühnemann-Schäfer & Kindl, Biochim. Biophys. Acta 1256, str. 181 až 186, 1995; Kunau a kol., Progr. Lipid Res. 34, str. 267 až 342, 1995; Stymne a kol., Biochemistry and Molecular Biology of Membrane and Storage Lipids of Plants, vyd. Murata a Somerville, Rockville, American Society of Plant Physiologists, str. 150 až 158, 1993; Murphy & Ross, Plant Journal 13(1), str. 1 až 16, 1998).

Vitaminy, kofaktory a "produkty pro výživu" ("nutraceuticals"), jako jsou PUFA, zahrnují skupinu molekul, které vyšší živočichové již nemohou syntetizovat, a proto je musí přijímat, nebo které vyšší živočichové již nemohou syntetizovat v dostatečné míře, a proto je musí přijímat, přesto, že jsou ochotně syntetizovány jinými organizmy, jako jsou například bakterie. Biosyntéza těchto molekul v organizmech, které jsou schopny je produkovat, jako jsou bakterie, je již více nebo méně charakterizována (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", svazek A27, str. 443 až 613, VCH Wein-

heim, 1996; Michal G. Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley & Sons 1999; Ong A.S., Niki E. & Packer L., "Nutrition, Lipids, Health and Diseases" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for free radical Research Asia, 1 až 3 září 1994, Penang, Malaysia, AOCS Press Champaign, IL X, 374 stran, 1994).

Shora uvedené molekuly jsou buď biologicky aktivními molekulami jako takové nebo jsou prekursory biologicky aktivních látek, které působí buď jako nosiče elektronů nebo jako mezi-produkty v multiplicitních metabolických cestách. Kromě své nutriční hodnoty mají tyto sloučeniny také významnou hodnotu jako barviva, antioxidanty nebo katalyzátory nebo jiné zpracovatelské pomocné látky (přehled struktury, aktivity a průmyslové využitelnosti těchto sloučenin je například v publikaci Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", svazek A27, str. 443 až 613, VCH Weinheim, 1996). Polynenasycené mastné kyseliny mají různé funkce a zdraví podporující charakteristiky, například v případě koronárních nemocí srdce, mechanismu zánětů a dětské výživy (Simopoulos, Am. J. Clin. Nutr. 70 (3. doplněk), str. 560 až 569, 1999; Takahata a kol., Biosc. Biotechnol. Biochem. 62(11), str. 2079 až 2085, Willich a Winther, 1998; Willich a Winther, Deutsche Medizinische Wochenschrift 120(7), od str. 229, 1995).

II. Elementy a způsoby podle vynálezu

Vynález alespoň zčásti je založen na objevu nových molekul, označovaných zde jako molekuly PSE nukleové kyseliny a PSE proteinu, které ovlivňují produkci buněčných membrán v organizmech, jako jsou *Physcomitrella patens*, *Cryptocodium*, *Phytophthora infestans*, *Thraustochytrium* a/nebo *Ceratodon purpureus*, například mají vliv na pohyb molekul těmito membránami. Podle jednoho provedení vynálezu se PSE molekuly

podílejí na metabolismu sloučenin potřebných pro syntézu buněčných membrán v organizmech, jako jsou mikroorganismy a rostliny, nebo nepřímo působí na transport molekul těmito membránami. Podle výhodného provedení vynálezu má aktivita PSE molekul podle vynálezu pro regulaci produkce membránových komponent a membránového transportu vliv na produkci žádané jemné chemikálie organismem. Podle zvláště výhodného provedení vynálezu se aktivita PSE molekul podle vynálezu moduluje, takže výtěžek, produkce a/nebo produkční účinnost metabolické cesty mikroorganismu nebo rostlin, která se reguluje PSE podle vynálezu se moduluje a účinnost transportu sloučenin membránami se modifikuje, což buď přímo nebo nepřímo moduluje výtěžek, produkci a/nebo produkční účinnost žádané jemné chemikálie mikroorganismy nebo rostlinami.

Výraz PSE nebo PSE polypeptid zahrnuje proteiny, které se podílejí na metabolismu sloučenin potřebných pro syntézu buněčných membrán v organizmech, jako jsou například mikroorganismy nebo rostliny, nebo na transportu molekul těmito membránami. Příklady PSE jsou uvedeny v sekvencích, jako jsou SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11 nebo jejich homology, deriváty nebo analogy. Výrazy PSE nebo PSE nukleové kyselinové sekvence zahrnují sekvence nukleové kyseliny, které kódují PSE a jejichž část může být kódujícím regionem a také odpovídají 5'- a 3'- netranslatovaným sekvencním regionům. Příklad PSE genů jsou sekvence v SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11. Výrazy produkce a produktivita jsou v oboru známé a zahrnují koncentraci fermentačního produktu (například žádané jemné chemikálie), který se vytvoří v určité době a v určitém fermentačním objemu (například 1 kg produktu za hodinu v 1 litru). Výraz produkční účinnost zahrnuje dobu potřebnou pro dosažení určitého množství produktu (například dobu potřebnou buňkou k ustanovení určitého prosazení jemné chemikálie). Výrazem výtěžek nebo výtěžek produkt/uhlík je

v oboru znám a zahrnuje účinnost, se kterou se uhlíkatý zdroj převádí na produkt (například na jemnou chemikálii). Zpravidla se vyjadřuje jako například 1 kg produktu na 1 kg zdroje uhlíku. Se vzrůstajícím výtěžkem nebo produkcí sloučeniny vzrůstá množství získaných molekul nebo hodných molekul této sloučeniny ve specifickém množství kultury v definované době. Výrazy biosyntéza nebo biosyntézní cesta jsou v oboru známy a zahrnují syntézu sloučeniny, s výhodou organické sloučeniny, buňkou z meziproductů, například několikastupňovým procesem, který podléhá přísné regulaci. Výraz katabolizmus a katabolická cesta je v oboru znám a zahrnuje štěpení sloučeniny, s výhodou organické sloučeniny, buňkou na katabolity (obecně menší nebo méně komplexní molekuly) například v několikastupňovém procesu, který podléhá přísné regulaci. Výraz metabolismus je v oboru znám a zahrnuje souhrn biochemických reakcí, ke kterým dochází v organismu. Metabolizmus určité sloučeniny (například metabolismus mastné kyseliny) tak zahrnuje souhrn biosyntézních, modifikačních a katabolických cest sloučeniny v buňce, které jsou relevantní pro sloučeninu.

Podle jiného provedení vynálezu PSE molekuly podle vynálezu mohou modulovat produkci žádané molekuly, jako je jemná chemikálie, v mikroorganismech nebo v rostlinách. Existuje řada mechanismů, kterými modifikace PSE podle vynálezu mohou přímo ovlivňovat, výtěžek, produkci a/nebo produkční účinnost jemné chemikálie z kmene mikroorganismu nebo z kmene rostliny obsahující tento modifikovaný protein. Počet nebo aktivita PSE, podílejících se na transportu molekul jemné chemikálie uvnitř nebo vně buňky, se může zvyšovat, takže se větší množství těchto sloučenin transportuje membránami, ze kterých se mohou získat a konvertovat snadněji na každou jinou sloučeninu. Kromě toho mastné kyseliny, triacylglyceroly a/nebo lipidy jsou žádoucími jemnými chemikáliemi jako takové; optimalizace aktivity nebo zvýšení počtu jedné nebo několika PSE podle vynálezu, které se podílejí na biosyntéze těchto sloučenin, nebo

interferencí s aktivitou jedné nebo několika PSE, které se podílejí na katabolizmu těchto sloučenin, umožňují zvyšovat výtěžek, produkci a/nebo produkční účinnost molekul mastné kyseliny a molekul lipidů z organismu, jako jsou mikroorganismy nebo rostliny.

Mutagenze PSE genu podle vynálezu může také zvyšovat PSE s modifikovanými aktivitami, což nepřímo ovlivňuje produkci jedné nebo několika žádaných jemných chemikálií z mikroorganismů nebo z rostlin. Například PSE podle vynálezu, která se podílí na exportu odpadních produktů, může vyvíjet velký počet aktivit nebo vyšší aktivitu, takže normální metabolické odpadní produkty buňky (jejichž počet se může zvýšit na nadprodukcii se zřetelem na žádanou chemikálii) se exportuje účinněji předtím, než může poškodit molekuly v buňce (které by snížily životnost buňky) nebo nerušovat biosyntézní cestu jemných chemikálií (což by snižovalo výtěžek, produkci nebo produkční účinnost žádané jemné chemikálie). Relativně velká intracelulární množství žádané jemné chemikálie samotná mohou být dále toxická pro buňku, takže zvýšení aktivity nebo počtu transporterů schopných exportovat tyto sloučeniny z buňky vede ke zvýšení životnosti buňky v kultuře, což opět vede k vyššímu počtu buněk v kultuře, které produkují žádanou jemnou chemikálii. PSE podle vynálezu se také mohou manipulovat tak, že se produkuje odpovídající množství různých lipidových molekul a molekul mastné kyseliny. To může mít podstatný vliv na složení lipidu v buněčné membráně. Jelikož má každý lipidový typ různé fyzikální vlastnosti, modifikace lipidového složení membrány může značně modifikovat fluiditu membrány. Modifikace fluidity membrány může ovlivnit transport molekul membránou a buněčnou integritu, což může podstatně ovlivnit produkci jemných chemikálií z mikroorganismů a z rostlin v provozní fermentační kultuře. Rostlinné membrány přinášejí specifické vlastnosti, například toleranci k vysokým a k nízkým teplotám, k soli, k období sucha a k patogenům, jako jsou bakterie a houby. Modulace

složek membrán může mít proto rozhodující vliv na schopnost rostliny přežít za shora uvedených stresových podmínek. To může být prostřednictvím zněm signálních kaskád nebo přímou cestou modifikovaného složení membrány (Chapman, Trends in Plant Science 3(11), str. 419 až 426, 1998) a signálních kaskád (Wang, Plant Physiology 120, str. 645 až 651, 1999) nebo ovlivněním tolerance k nízkým teplotám (světový patentový spis číslo WO 95/18222).

Isolované sekvence nukleové kyseliny podle vynálezu jsou obsaženy například v genomu kmene *Thraustochytrium*, který je dostupný v kolekci kultur American Type Culture Collection (ATCC) jako kmen číslo ATCC26185 (*Thraustochytrium*), nebo v případě organismu *Cryptocodinium*, který je dostupný v organizaci Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton (CCMP) West Boothbay Harbour, ME, Sp. st. a.) jako kmen číslo CCPM316. V případě *Phytophthora infestans* jsou molekuly uvedené nukleové kyseliny izolovány ze kmene ATCC 48886.

Nukleotidová sekvence izolované cDNA mikroorganismů *Physcomitrella*, *Cryptocodinium*, *Phytophthora infestans* nebo *Thraustochytrium* a dedukované aminokyselinové sekvence *Physcomitrella patens* PSE jsou ukázány v sekvencích SEQ ID NO:1 až SEQ ID NO: 12. Prováděly se počítačové analýzy, které klasifikovaly nebo identifikovaly tyto nukleotidové sekvence jakožto sekvence, které kódují proteiny podílející se na metabolismu složek buněčné membrány nebo podílející se na transportu sloučenin buněčnými membránami nebo na biosyntéze PUFA. EST s databázovým vstupem číslo PPO01019019F, CCO01042041R, PIO01002014R, TCO02034029R, TCO02034029R-11 a TCO02014093R v databázi vynálezce představuje sekvence v SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11. Podboným způsobem parciální polypeptidy byly označeny PPO01019019F, CCO01042041R, PIO01002014R, TCO02034029R, TCO02034029R-11 a

150700

TC002014093R a představují sekvence podle vynálezu v SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12 podle tabulky II. Kompletní fragmentový insert EST TC002034029R se sekvencuje a vede k SEQ ID NO:3, která je kompletní sekvencí TC002034029R. TC002034029R-11 popisuje sekvenci plné délky elongázy z mikroorganismu *Thraustochytrium*. Jména zbylých klonů jsou obdobná. Tedy odpovídající genová jména jsou přidělena k různým klonům. Zkratka: Tc = *Thraustochytrium*., Cc = *Crypthecodinium*, Pp = *Physcomitrella patens* a P = *Phytophthora infestans*.

Tabulka II

Jméno/EST jméno	Genové jméno	Polypeptid SEQ ID NO	Nukleová kyselina SEQ ID NO
PPO01019019F	Pp_PSE1	2	1
TC002034029R,	Tc_PSE1	4	3
TC002014093R	Tc_PSE2	6	5
CC001042041R,	Cc_PSE1	8	7
TC002034029R-11	Pc_PSE1 1	10	9
PI001002014R,	Pi_PSE1	12	11

Vynález se také týká proteinů s aminokyselinovou sekvencí, která je v podstatě homologická s aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12. Podle vynálezu protein s aminokyselinovou sekvencí, která je v podstatě homologická s vybranou ami-

18.07.02

nokyselinovou sekvencí má alespoň 50% homologii s vybranou aminokyselinovou sekvencí například kompletní zvolenou aminokyselinovou sekvencí. Protein s aminokyselinovou sekvencí, která je v podstatě homologická s aminokyselinovou sekvencí může mít alespoň přibližně 50% až 60%, s výhodou alespoň 60% až 70%, ještě výhodněji alespoň přibližně 70% až 80%, 80% až 90% nebo 90% až 95% a ještě výhodněji alespoň přibližně 96%, 97%, 98%, 99% nebo vyšší homologii s vybranou aminokyselinovou sekvencí.

PSE podle vynálezu nebo její biologicky aktivní část nebo její fragment se mohou podílet na metabolismu sloučenin potřebných pro syntézu buněčných membrán v mikroorganizmech nebo v rostlinách nebo na transportu molekul těmito membránami nebo má jednu nebo několik aktivit potřebných pro elongaci PUFA se 16 nebo 18 nebo 20 atomy uhlíku, takže se získají PUFA s 20, s 22 nebo s 24 a dalšími atomy uhlíku.

Různá hlediska vynálezu jsou podrobněji popsána v následujících pododílech.

A. izolované molekuly nukleové kyseliny

Jedno provedení vynálezu zahrnuje izolované nukleové kyseliny odvozené od PUFA produkujících mikroorganismů a kodujících polypeptidy, které elongují mastné kyseliny se 16 nebo 18 atomy uhlíku s alespoň dvěma dvojnými vazbami v mastné kyselině o alespoň dva atomy uhlíku nebo které elongují mastné kyseliny s 20 atomy uhlíku s alespoň dvěma dvojnými vazbami v mastné kyselině o alespoň dva atomy uhlíku.

Další provedení vynálezu zahrnuje izolované mastné kyseliny zahrnující nukleotidové sekvence kodující polypeptidy, které elongují mastné kyseliny se 16, 18 nebo 20 atomy uhlíku s alespoň dvěma dvojnými vazbami v mastné kyselině ze souboru zahrnujícího

18.07.00

- a) nukleové kyselinové sekvence uvedené v SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11,
- b) nukleovou kyselinovou sekvenci, která podle degenerace genetického kódu je odvozena z jedné sekvence uvedené v SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11,
- c) deriváty sekvencí uvedené v SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11, které kódují polypeptidy aminokyselinové sekvence uvedené v SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, a SEQ ID NO:12 a které mají alespoň 50% homologii se zřetel-lem na aminokyseliny bez podstatného snížení enzymatického působení polypeptidů.

Shora uvedené nukleové kyseliny podle vynálezu, které působí jako elongázy se 16, 18 nebo 20 atomy uhlíku jsou odvoze-ny od organismů, jako jsou ciliates, houby, řasy, rostliny ne-bo dinobičíkovci, které jsou schopny syntetizovat mastné PUFA s výhodou z rostlin nebo z řas, zvláště z organismů rodu *Phytophthora*, *Crypthecodinium*, *Thraustochytrium* nebo *Schizochytrium*, ještě výhodněji z organismů *Phytophthora infestans*, *Phy-scomitrella patens*, *Crypthecodinium cohnii* nebo *Thraustochyt-rium* sp., *Schizochytrium* sp. nebo z úzce příbuzných organismů.

Vynález se týká izolovaných nukleových kyselinových molekul, které kódují PSE polypeptidy nebo jejich biologicky aktivní části a fragmentů nukleových kyselin, které jsou dostatečné pro použití jako hybridizační sondy nebo primery pro identifikaci nebo zesílení PSE kodující nukleové kyseliny (například PSE DNA). Výraz "molekula nukleové kyseliny" zde zahrnuje DNA molekuly (například cDNA nebo genomovou DNA) a RNA molekuly (například mRNA) a DNA a RNA analogy, které se

generují prostřednictvím nukleotidových analogů. Tento výraz rovněž zahrnuje netranslatovanou sekvenci na 3' a 5' zakončení kódujícího genového regionu: alespoň přibližně 100 nukleotidů sekvence ve směru 5' zakončení kódujícího regionu a alespoň přibližně 20 nukleotidů sekvence ve směru 3' zakončení kódujícího genového regionu. Molekula nukleové kyseliny může být jednořetězcová nebo dvouřetězcová, s výhodou je to však dvouřetězcová DNA. Izolovaná molekula nukleové kyseliny je oddělena od ostatních molekul nukleové kyseliny, které jsou obsaženy v přírodním zdroji nukleových kyselin. "Izolovaná" nukleová kyselina s výhodou nemá žádné sekvence, které přirozeně lemují nukleovou kyselinu v genomové DNA organismu, ze kterého je nukleová kyselina odvozena (například sekvence na 5' a 3' zakončení nukleové kyseliny). Podle různých provedení izolovaná molekula nukleové kyseliny může obsahovat například méně než přibližně 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb nebo 0,1 kb nukleotidových sekvencí, které přirodně lemují molekulu nukleové kyseliny v genomové DNA buňce, ze které je nukleová kyselina odvozena (například buňka *Physcomitrella patens*). "Izolovaná" molekula nukleové kyseliny, například molekula cDNA, může být nadto prostá jiného buněčného materiálu nebo kultivačního prostředí, pokud je generována rekombinantními technikami nebo může být prostá chemických prekurzorů nebo jiných chemikálií, pokud je chemicky syntetizována.

Molekula nukleové kyseliny podle vynálezu, například molekula nukleové kyseliny s nukleotidovou sekvencí SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11 nebo její část se může izolovat o sobě známými způsoby molekulární biologie a obsaženou sekvenční informací. Tedy například homologová sekvence nebo homologové, konzervované sekvenční regiony na DNA nebo aminokyselinové úrovni se mohou identifikovat pomocí přiřazených algoritmů. Například *Phytophthora*, *Physcomitrella*, *Crypthecodinium* nebo *Thraustochytrium* cDNA se mohou izolovat z knihovny *Phytophthora*, *Physcomitrel-*

190700

la, Crypthecodinium nebo Thraustochytrium za použití kompletních sekvencí SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a/nebo SEQ ID NO:11 nebo jejich částí jako hybridizační sondy a o sobě známými hybridizačními způsoby (jako například popsal Sambrook a kol., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Nadto molekula nukleové kyseliny obsahující kompletní sekvenci SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11 nebo její část se může izolovat polymerázovou řetězovou reakcí, když se používají oligonukleotidové primery, které se generují na základě této sekvence nebo jejich částí, zvláště regionu okolo motivu His-box SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12 nebo jejich modifikací na jednotlivé, definované aminokyseliny (například molekula nukleové kyseliny obsahující kompletní sekvenci SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11 nebo její část se může izolovat polymerázovou řetězovou reakcí, když se používají oligonukleotidové primery, které se generují na základě téže sekvence SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11. Pro tento účel jsou zvláště vhodné parciální sekvence podle obr. 10. Například mRNA se může izolovat z buněk (například za použití guanidiniumthiokyanátové extrakce, kterou popsal Chirgwin a kol., Biochemistry 18, str. 5294 až 5299, 1979) a cDNA se může generovat za použití reverzní transkriptázy (například Moloney MLV reverzní transkriptázou, obchodním produktem společnosti Gibco/BRL, Bethesda, MD nebo AMV reverzní transkriptázou, obchodním produktem společnosti Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, Fl). Syntetické oligonukleotidové primery pro zesílení polymerázovou řetězovou reakcí se mohou generovat na základě jedné nukleotidové sekvence uvedené v SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9 nebo 11 nebo za použití aminokyselinových sekvencí podle obr. 10. Nukleová kyselina podle vynálezu se může zesílit za použití cDNA nebo za použití

180700

genomové DNA jako matrice a vhodných oligonukleotidových primerů o sobě známými způsoby PCR zesílení. Nukleová kyselina, takto zesílená, se může klónovat do vhodného vektoru a charakterizovat prostřednictvím DNA sekvenční analýzy. Oligonukleotidy, které odpovídají PSE nukleotidové sekvenci, se mohou generovat o sobě známými syntézními způsoby například za použití automatického DNA syntetizéru.

cNDA uvedená v SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11 zahrnuje sekvence, které kódují PSE (to je "kódující region") a také 5'-netranslatované sekvence a 3'-netranslatované sekvence. Nebo molekula nukleové kyseliny může zahrnovat pouze kódující region jedné sekvence ze souboru sekvencí SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11 nebo může obsahovat kompletní genomové fragmenty izolované z genomové DNA.

Sekvence SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12 se identifikují stejným EST číslem jako sekvence SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11 pro snadnou korelaci.

Podle dalšího provedení vynálezu zahrnuje izolovaná molekula nukleové kyseliny podle vynálezu molekulu nukleové kyseliny, která je komplementem jedné nukleotidové sekvence ze souboru zahrnujícího SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11 nebo jejich části. Molekula nukleové kyseliny, která je komplementární s jednou nukleotidovou sekvencí ze souboru zahrnujícího SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11 je dostatečně komplementární, pokud je schopná hybridizovat s jednou sekvencí ze souboru zahrnujícího SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11, vedoucí ke stabilnímu duplexu.

18.07.00

Homology nových elongázových nukleových kyselinových sekvencí se sekvencí SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11 se míní například allelické varianty, které mají alespoň přibližně 50% až 60%, s výhodou alespoň 60% až 70%, ještě výhodněji alespoň přibližně 70% až 80%, 80% až 90% nebo 90% až 95% a ještě výhodněji alespoň přibližně 95%, 96%, 97%, 98%, 99% nebo vyšší homologii s nukleotidovou sekvencí ze souboru sekvencí SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11 nebo s jejich homology, deriváty, analogy nebo částmi. Podle výhodného provedení zahrnuje izolovaná molekula nukleové kyseliny podle vynálezu nukleotidovou sekvenci, která hybridizuje s jednou z nukleotidových sekvencí ze souboru sekvencí SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11 nebo s jejich částmi za přísných podmínek. Allelické varianty zahrnují zvláště funkční varianty, které se mohou získat delecí, inzercí nebo substitucí nukleotidů z/do sekvence ze souboru sekvencí SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11, přičemž se však pro enzymovou aktivitu rezultujícího proteinu, který se syntetizuje, dbá na to, aby byla s výhodou zachována pro inzerci jednoho nebo několika genů. Proteiny, které si podržují enzymatickou aktivitu elongázy se míní proteiny, které kódují alespoň 10 %, s výhodou alespoň 20 %, ještě výhodněji alespoň 30 % a především alespoň 40 % původní enzymatické aktivity ve srovnání s proteinem kódovaným sekvencemi SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12. Elongázami, které si uchovávají shora uvedené aktivity, jsou elongázy, jejichž enzymatická aktivita není v podstatě snížena.

Homology sekvencí SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11, se také míní například bakteriální, houbové a rostlinné homology, useknuté sekvence, jednořetězcové DNA nebo RNA kódující nebo nekódující DNA sekvence.

180700

Homology sekvencí SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11, se také mívají deriváty například promotorové varianty. Promotory ve směru nukleotidových sekvencí mohou modifikovat jednu nebo několik nukleotidových substitucí inzercí nebo inzerce a/nebo delecí nebo delecemi avšak bez narušení funkcionality nebo aktivity promotorů. Je dále možné zvýšit aktivitu promotorů modifikací jejich sekvence nebo nahradit je dokonale aktivnějšími promotory právě z heterologového organismu.

Molekula nukleové kyseliny podle vynálezu může nejen obsahovat část kódujícího regionu ze sekvencí SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11, například fragment, kterého se může použít jako sondy nebo primeru nebo fragment, který kóduje biologicky aktivní segment PSE. Nukleotidové sekvence, stanovené z klonování PSE genu *Physcomitrella patens*, *Phytophthora infestans*, *Thraustochytrium* a *Schizochytrium*, umožňují generovat sondy a primery, které jsou určeny pro identifikaci a/nebo klónování PSE homologů v jiných buněčných typech a organizmech a PSE homology z jiných mechů nebo podobných druhů. Sonda/primer zpravidla obsahují v podstatě vyčištěný oligonukleotid. Oligonukleotid zpravidla obsahuje nukleotidový sekvencí region, který hybridizuje za přísných podmínek s alespoň přibližně 12, s výhodou alespoň s přibližně 16 a především s alespoň přibližně 25, 40, 50 nebo 75 následnými nukleotidy řetězce majícího smysl ze sekvencí ze souboru zahrnujícího SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11 nebo řetězce nemajícího smysl ze sekvencí ze souboru zahrnujícího SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11 nebo jejich homology, deriváty a analogy nebo jejich přírodně se vyskytujícími mutanty. Primery založené na nukleotidové sekvenci SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11 se mohou používat při PCR reakcích pro klónování PSE homologů. Sondy založené na PSE

19.07.00

nukleotidových sekvencích se mohou používat pro detekci transkriptů nebo genomových sekvencí, které kódují stejné nebo homologové proteiny. Podle výhodného provedení zahrnuje sonda přídatně navázanou značkovací skupinu, například radioizotop, fluorescenční sloučeninu, enzym nebo enzymový kofaktor. Tyto sondy se mohou používat jako součásti testovacího kitu pro genomové signální znaky pro identifikaci buněk, které chybně expresují PSE, třeba měřením množství PSE kódující nukleové kyseliny ve vzorku buňky, například měřením PSE mRNA hladiny nebo pro stanovení, zda je genomový PSE gen mutován nebo deletován.

Podle jednoho provedení vynálezu molekula nukleové kyseliny podle vynálezu kóduje protein nebo jeho část, která zahrnuje aminokyselinovou sekvenci, která je dostatečně homologová s aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12 pro protein nebo jeho část k udržení schopnosti podílet se na metabolismu sloučenin potřebné pro syntézu buněčné membrány v mikroorganizmech nebo v rostlinách nebo na transportu molekuly těmito membránami. Výraz "dostatečná homologie" se zde vztahuje na proteiny nebo jejich část, jejichž aminokyselinové sekvence mají minimální počet aminokyselinových zbytků (například aminokyselinový zbytek s podobným postranním řetězcem, jako aminokyselinový zbytek v jedné ze sekvencí SEQ ID NO:2 až 12), které jsou identické nebo ekvivalentní s aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12, takže se protein nebo jeho část může podílet na metabolismu sloučenin potřebných pro syntézu buněčných membrán v mikroorganizmech nebo v rostlinách nebo na transportu molekul těmito membránami. Jak shora uvedeno, proteinové složky těchto metabolických cest pro membránové složky nebo pro membránový transportní systém mohou mít význam pro produkci a sekreci jedné nebo několika jenných chemikálií. Příklady těchto aktivit jsou zde popsány. Tak se "funkce PSE" podílí buď přímo nebo nepřímo na výtěžku, produkci a/nebo

18.07.00

produkční účinnosti jedné nebo několika jemných chemikálií. Příklady PSE substrátových specifík katalytické účinnosti jsou uvedeny v tabulce I.

Podle dalšího provedení vynálezu deriváty molekul nukleové kyseliny podle vynálezu kódují proteiny, které mají alespoň přibližně 50% až 60%, s výhodou alespoň 60% až 70%, ještě výhodněji alespoň přibližně 70% až 80%, 80% až 90% nebo 90% až 95% a ještě výhodněji alespoň přibližně 96%, 97%, 98%, 99% nebo vyšší homologii s kompletní aminokyselinovou sekvencí ze souboru sekvencí SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12. Homologie aminokyselinové sekvence se stanovuje v celém sekvenčním regionu programem PileUP (J. Mol. Evolution 25, str. 351 až 360, 1987; Higgins a kol., CABIOS, 5, str. 151 až 153, 1989) nebo BESTFIT nebo GAP (Henikoff S. a Henikoff J.G., Amino acid substitution matrices from protein blocks, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, str. 10915 až 10919, 1992).

Částmi proteinu, kódované molekulami nukleové kyseliny podle vynálezu, jsou s výhodou biologicky aktivní části jedné z PSE. Zde používaný výraz "biologicky aktivní části PSE" zahrnuje segment, například doména/motiv, PSE, který se podílí na metabolismu žádaných sloučenin pro syntézu buněčné membrány v mikroorganismech nebo v rostlinách nebo na transportu molekul membránami mikroorganismu, nebo jehož aktivity jsou uvedeny v tabulce I. Provádí se zkouška enzymatické aktivity ke stanovení, zda se PSE nebo její biologicky aktivní část může podílet na metabolismu žádaných sloučenin pro syntézu buněčné membrány v mikroorganismech nebo v rostlinách nebo na transportu molekul těmito membránami. Tyto zkušební způsoby jsou podrobně popsány v příkladu 8 příkladové části a jsou známy pracovníkům v oboru.

Přídavné fragmenty nukleové kyseliny, které kódují bio-

19.07.00

logicky aktivní segmenty PSE, se mohou generovat izolací části jedné z těchto sekvencí SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12, expresí kódovaného segmentu PSE nebo peptidu (například rekombinantní expresí in vitro) a stanovením aktivity zakódované části PSE nebo peptidu.

Vynález zahrnuje také molekuly nukleové kyseliny, které se liší od jedné z nukleotidových sekvencí ze souboru SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11 (nebo jejich části) se zřetelem na degeneraci genetického kódu a které takto kódují stejnou PSE jako PSE zakódovanou nukleotidovou sekvencí ze souboru SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11. Podle jiného provedení izolovaná molekula nukleové kyseliny podle vynálezu má nukleotidovou sekvenci, která kóduje protein s aminokyselinovou sekvencí ze souboru zahrnujícího SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12. Podle dalšího provedení molekula nukleové kyseliny podle vynálezu kóduje PSE protein v plné délce, který je v podstatě homologický s aminokyselinovou sekvencí ze souboru SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12 (která je zakódována otevřeným čtecím rámcem v sekvencích ze souboru SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11) a která se může identifikovat a izolovat o sobě známými způsoby.

Kromě PSE nukleotidových sekvencí ze souboru SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11 je pracovníkům v oboru zřejmé, že mohou existovat DNA sekvenční polymorfizmy, které vedou ke změně aminokyselinových sekvencí PSE v rámci populace (například populace *Physcomitrella*, *Phytophthora*, *Crypthecodinium* nebo *Thraustochytrium*). Tyto genetické polymorfizmy v PSE genu mohou existovat mezi individui v populaci v důsledku přírodní variace. Výrazem "gen" a "rekombinantní gen" se zde vždy míní molekuly nukleové

18.07.00

kyseliny, které otvírají čtecí rámec, který kóduje PSE, s výhodou *Phytophthora*, *Physcomitrella*, *Crypthecodinium* nebo *Thraustochytrium* PSE. Tyto přírodní varianty zpravidla způsobují 1 až 5% varianci v nukleotidové sekvenci PSE genu. Všechny tyto nukleotidové variance a rezultující aminokyselinové polymorfizmy v PSE, které mohou být následkem přírodní variance a nemění funkční aktivitu PSE spadají rovněž do rozsahu vynálezu.

Molekuly nukleové kyseliny, které odpovídají přírodním variantám a ne-*Physcomitrellové*, ne-*Phytophthorové*, ne-*Crypthecodiniové* nebo ne-*Thraustochytriové* homology, deriváty a analogy cDNA organismů *Physcomitrella*, *Phytophthora*, *Crypthecodinium* nebo *Thraustochytrium* se mohou izolovat o sobě známými hybridizačními způsoby za přísných hybridizačních podmínek se zřetelem na své homology se PSE nukleovou kyselinou *Physcomitrella*, *Phytophthora*, *Crypthecodinium* nebo *Thraustochytrium* zde uvedenou za použití cDNA nebo její části organismů *Physcomitrella*, *Phytophthora*, *Crypthecodinium* nebo *Thraustochytrium* jakožto hybridizační sondy. Podle jiného provedení vynálezu izolovaná molekula nukleové kyseliny podle vynálezu má minimální délku 15 nukleotidů a hybridizuje za přísných podmínek s molekulou nukleové kyseliny, která zahrnuje nukleotidovou sekvenci SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11. Podle jiného provedení vynálezu má nukleová kyselina podle vynálezu minimální délku 25, 50, 100, 250 nebo více nukleotidů. Výrazem "hybridizuje za přísných podmínek" se vždy míní podmínky hybridizace a promývání, za kterých nukleotidové sekvence mají alespoň 60% homologii s ostatními, zpravidla navzájem hybridizujícími. Podmínky jsou s výhodou takové, že sekvence, která má alespoň přibližně 65% a výhodněji alespoň přibližně 70% a nejvýhodněji alespoň přibližně 75% nebo vyšší homologii s ostatními zpravidla hybridizuje s ostatními. Tyto přísné podmínky jsou pracovníkům v oboru známy a jsou dostupné v návodech (Current Protocols in Mo-

18.07.00

lecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 6.3.1-6.3.6, 1989).
Výhodný, nikoliv však omezující příklad přísných hybridizačních podmínek jsou hybridizace v $6 \times$ chlorid sodný/citrát sodný (sodium chlorid/sodium citrát = SSC) při teplotě přibližně 45°C a následné promytí v jednom nebo v několika stupních v $0,2 \times$ SSC, $0,1\%$ SDS při teplotě 50 až 65°C . Pracovníkům v oboru je známo, že se hybridizační podmínky liší v závislosti na typu nukleové kyseliny, například v přítomnosti organických rozpouštědel, se zřetelem na teplotu a koncentraci pufru. Například je teplota za "standardních hybridizačních podmínek" v závislosti na typu nukleové kyseliny 42 až 58°C ve vodném pufru za koncentrace $0,1$ až $5 \times$ SSC (hodnota pH 7,2). V přítomnosti organického rozpouštědla ve shora uvedeném pufru, například 50% formamidu, je teplota za standardních podmínek přibližně 42°C . Jako hybridizační podmínky pro DNA:DNA hybridy se jako výhodné uvádí například $0,1 \times$ SSC a 20 až 45°C , zvláště 30 až 45°C . Hybridizační podmínky pro hybridy DNA:RNA jsou s výhodou například $0,1 \times$ SSC a 30 až 55°C , zvláště 45 až 55°C . Shora uvedené hybridizační podmínky se stanovují například pro nukleovou kyselinu přibližně v délce 100 bp (párů bází) a obsahu G + C 50% v nepřítomnosti formamidu. Pracovníkům v oboru je známo, jak se mohou stanovit potřebné hybridizační podmínky se zřetelem na příručky, jako je shora uvedená publikace Sambrook a kol. (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; Hames and Higgins, "Nucleic Acids Hybridization: A practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford (vyd.) 1985; Brown, "Essential Molecular Biology", A practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford (vyd.) 1991).

S výhodou izolovaná molekula nukleové kyseliny podle vynálezu, která hybridizuje za přísných podmínek se sekvencí SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11 odpovídá přirodně se vyskytující molekule nukleové kyseliny. Výrazem "přirodně se vyskytující" molekule nukle-

180700

ové kyseliny se zde míní RNA nebo DNA molekula, s nukleotidovou sekvencí, která se vyskytuje v přírodě (například která kóduje přírodní protein). Podle jednoho provedení vynálezu nukleová kyselina kóduje přírodně se vyskytující *Physcomitrella patens* PSE, *Phytophthora infestans* PSE, *Cryptocodium johnsonii* PSE, nebo *Thraustochytrium* PSE.

Kromě přírodně se vyskytujících variant PSE sekvence, která může existovat v populaci, je pracovníkům v oboru známo, že lze také zavést změny prostřednictvím mutace do nukleotidové sekvence SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11, které vedou ke změně aminokyselinové sekvence zakódované PSE bez nepříznivého ovlivnění funkcionality PSE proteinu. Například nukleotidové substituce, které zavádějí do aminokyselinových substitucí "neesenční" aminokyselinové zbytky se mohou generovat v sekvenci SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11. "Neesenciálním" aminokyselinovým zbytkem je zbytek, který se může měnit v sekvenci divokého typu jedné z PSE (SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12) bez změny aktivity PSE, zatímco "esenční" aminokyselinový zbytek je žádaný pro PSE aktivitu. Jiné aminokyselinové zbytky (například aminokyselinové zbytky, které se nekonzervují, nebo se jen semikonzervují v doméně se PSE) nemusí být však esenciální pro aktivitu, a proto se pravděpodobně mohou zaměnit bez změn PSE aktivity.

Vynález se také týká molekul nukleové kyseliny, které kóduje PSE obsahující zaměněné aminokyselinové zbytky, které nejsou esenciální pro aktivitu PSE. Tyto PSE se liší od sekvence SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12 se zřetělem na aminokyselinovou sekvenci za udržení alespoň jedné PSE aktivity zde popsané. Podle jednoho provedení vynálezu izolovaná molekula nukleové kyseliny zahrnuje nukleotidovou sekvenci kódující protein, protein

130700

zahrnuje aminokyselinovou sekvenci s alespoň přibližně 50% homologií s aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12 a schopnou podílet se na metabolismu sloučenin potřebných pro syntézu buněčných membrán v organizmech *Phytophthora*, *Physcomitrella*, *Crypthecodinium* nebo *Thraustochytrium* nebo na transportu molekul těmito membránami. Protein, kódovaný molekulou nukleové kyseliny, má s výhodou alespoň přibližně 50% až 60% homologii s jednou ze sekvencí zahrnující SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12, výhodněji alespoň přibližně 60% až 70% homologii s jednou ze sekvencí zahrnující SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12 a ještě výhodněji alespoň přibližně 70% až 80%, 80 až 90%, 90% až 95% homologii s jednou ze sekvencí zahrnující SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12 a nejvýhodněji alespoň přibližně 96%, 97%, 98% nebo 99% homologii s jednou ze sekvencí zahrnující SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12.

Ke stanovení procentové homologie se dvěma aminokyselinovými sekvencemi (například jedné ze sekvencí ze souboru zahrnujícího SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12 a jejich mutované formy) nebo dvou nukleových kyselin jsou sekvence psány jedna pod druhou k umožnění optimálního srovnání (například mezery mohou být zavedeny do sekvence proteinu nebo nukleové kyseliny k vytvoření optimálního vyrovnání s jiným proteinem nebo s jinou nukleovou kyselinou). Potom se porovnávají aminokyselinové zbytky nebo nukleotidy na odpovídajících aminokyselinových pozicích nebo nukleotidových pozicích. Jestliže je pozice v sekvenci (například jedna ze sekvencí SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12) okupována stejným aminokyselinovým zbytkem nebo stejným nukleotidem jako odpovídající pozice v jiné sekvenci (například mutovaná forma

100700

sekvence ze souboru zahrnujícího SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12) je molekula homologická v této pozici (tedy "homologie" aminokyseliny nebo nukleové kyseliny zde odpovídá "identitě" aminokyseliny nebo nukleové kyseliny). Procentová homologie mezi dvěma sekvencemi je funkcí počtu identických pozic, na kterých se sekvence podílejí (procento homologie se tedy rovná počtu identických pozic/celkový počet pozic x 100).

Izolovaná molekula nukleové kyseliny, která kóduje PSE, která je homologická s proteinovou sekvencí SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12 se může generovat zavedením jedné nebo několika nukleotidových substitucí, adicemi nebo delecemi do nukleotidové sekvence SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11, takže jedna nebo několik aminokyselinových substitucí, adicí nebo delecí se zavede do kodovaného proteinu. Mutace se může zavádět do jedné ze sekvencí SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11 o sobě známými způsoby, jako jsou místně řízená mutagenéze a PCR zprostředkovávaná mutagenéze. S výhodou se konzervativní aminokyselinové substituce generují na jednom nebo na několika předpověděných aminokyselinových antismyslových zbytcích. V "konzervativní aminokyselinové substituce" se vyměňuje aminokyselinový zbytek za aminokyselinový zbytek s podobným postranním řetězcem. Rodiny aminokyselinových zbytků s podobnými postranními řetězci byly definovány ve speciálním oboru. Tyto rodiny zahrnují aminokyseliny s bázičnými postranními řetězci (například lysin, arginin, histidin), s kyselými postranními řetězci (například kyselinu asparagovou, glutamovou), s polárními postranními řetězci bez náboje (například glycin, asparagin, glutamin, serin, threonin, tyrosin, cystein), s nepolárními postranními řetězci (například alanin, valin, leucin, isoleucin, prolin, fenylalanin, methionin, tryptofan), s β -rozvětvenými postranními řetězci (například

100700

threonin, valin, isoleucin) a s aromatickými postranními řetězci (například tyrosin, fenylalanin, tryptofan, histidin). Předpověděný aminokyselinový neesenciální zbytek v PSE se tak s výhodou zaměňuje za jiný aminokyselinový zbytek z téže rodiny s postranním řetězcem. Jako alternativa podle jiného provedení vynálezu se mohou mutace zavádět statisticky na všechny nebo na část PSE kódujících sekvencí, například saturační mutagenезí a získané mutanty se mohou skrínovat se zřetelem na PSE asktivitu zde popisovanou k identifikaci mutantů, které si udržují PSE aktivitu. Po mutagenезi jedné ze sekvencí SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11 se zakódovaný protein může expresovat rekombinantně a aktivita proteinu se může stanovovat například zkouškou zde popsanou (v příkladech praktického provedení).

Kromě molekul nukleové kyseliny, které kódují shora popsané PSE, se vynález také týká izolovaných molekul nukleové kyseliny k nim "antismyslným". "Antismyslová" nukleová kyselina zahrnuje nukleotidovou sekvenci, která je komplementární k nukleové kyselině "mající smysl", která kóduje protein, například ke kódujícímu řetězci dvouřetězcové cDNA molekuly nebo komplementární s mRNA sekvencí. Antismyslová nukleová kyselina se může vázat na nukleovou kyselinu mající smysl vodíkovými vazbami. Antismyslová nukleová kyselina může být komplementární s kompletem PSE - kódující řetězec nebo pouze s jeho částí. Podle jednoho provedení vynálezu molekula nukleové kyseliny je "antismyslová" ke "kódujícímu regionu" kódujícího řetězce nukleotidové sekvence kódující PSE. Výraz "kódující region" se týká regionu nukleotidové sekvence, která zahrnuje kodony, které jsou translatované do aminokyselinových zbytků (například celý kódující region, který startuje a končí se stop kodonem, to je posledním kodonem před stop kodonem). Podle dalšího provedení antismyslová molekula nukleové kyseliny je "antismyslový" až "nekódující region" kódujícího řetězce nukleotidové sekvence kódující PSE. Výraz "nekódující řetězec" se týká

13.07.02

5' a 3' sekvencí, které lemují kódující region a nejsou translatované do aminokyselin (to je, které jsou také končeny 5' - a 3' - netranslatovanými regiony).

Zde popisované PSE-kódující sekvence kódujícího řetězce (například sekvence ze souboru sekvencí zahrnujícího SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11) antismyslové nukleové kyseliny podle vynálezu se mohou označovat podle pravidel Watson-Crickova párování bází. Antismyslová molekula nukleové kyseliny může být komplementární ke všem kódujícím regionům PSE mRNA, avšak výhodněji je to oligonukleotid, který je "antismyslový" pouze k části kódujícího nebo nekódujícího regionu PSE mRNA. Například antismyslový oligonukleotid může být komplementárním k regionu okolo translačního startu PSE mRNA. Antismyslový oligonukleotid může mít délku například přibližně 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 nebo 50 a více nukleotidů. Antismyslový oligonukleotid má s výhodou ve své délce 15 až 25 nukleotidů. Antismyslový oligonukleotid podle vynálezu se může konstruovat způsobem v oboru známým za použití chemických syntézních a enzymatických ligačních reakcí. Například antismyslová nukleová kyselina (například antismyslový oligonukleotid) se může syntetizovat chemicky za použití přírodně se vyskytujících nukleotidů nebo různě modifikovaných nukleotidů, které zvyšují biologickou stabilitu molekul nebo zvyšují fyzikální stabilitu duplexu vytvořeného mezi nukleovou kyselinou antismyslovou a mající smysl; například se mohou použít fosforthoátové deriváty a akridinem substituované nukleotidy. Jakožto příklady modifikovaných nukleotidů, kterých se může použít pro generaci antismyslové nukleové kyseliny, se uvádějí: 5-fluoruracyl, 5-bromuracyl, 5-chloruracyl, 5-joduracyl, hypoxanthin, xanthin, 4-acetylcytosin, 5-(karboxyhydroxymethyl)uracyl, 5-(karboxymethylaminomethyl-2-thiouridin, 5-(karboxymethylaminomethyluracyl, dihydrouracyl, β -D-galaktosylkveosin, inosin, 6N-isopentenyladenin, 1-methylguanin, 1-methylinosin, 2,2-dimethylguanin, 2-methyladenin, 2-

19.07.02

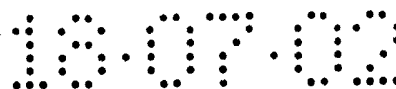
-methylguanin, 3-methylcytosin, 5-methylcytosin, N6-adenin, 7-methylguanin, 5-methylaminomethyluracyl, 5-methoxyaminomethyl-2-thiouracyl, β -D-mannosylkveosin, 5'-methoxykarboxymethyluracyl, 5-methoxyuracyl, 2-methylthio-6N-isopentyladenin, uracyl-5-oxyoctová kyselina (v), xybutoxin, pseudouracyl, kveosin, 2-thiocytosin, 5-methyl-2-thiouracyl, 2-thiouracyl, 4-thiouracyl, 5-methyluracyl, methyluracyl-5-oxyacetát, uracyl-5-oxyoctová kyselina (v), 5-methyl-2-thiouracyl, 3-(3-amino-3-N-2-karboxypropyl)uracyl, (acp3)w a 2,6-diaminopurium. Nebo se antismyslová nukleová kyselina může generovat biologicky za použití expresního vektoru, do kterého se subklonovanou nukleovou kyselinou v antismyslové orientaci (to je RNA, která je transkribována nukleovou kyselinou zavedenou v antismyslové orientaci se zřetelem na cílovou příslušnou nukleovou kyselinu, která je transskribována ve větším detailu v následující subsekcii).

Antismyslová molekula nukleové kyseliny podle vynálezu se zpravidla dodává do buňky nebo se generuje in situ, takže hybridizuje s buněčnou mRNA nebo se váže s buněčnou mRNA a/nebo s genomovou DNA kodující PSE, takže inhibuje expresi proteinu například inhibicí transkripce a/nebo translace. Hybridizace se může uskutečnit běžnou nukleotidovou komplementaritou za vytvoření stabilního duplexu nebo například v případě antismyslové molekuly nukleové kyseliny, která váže duplicitu DNA, specifickou interakcí v širokém rozštěpu dvojité šroubovice. Antismyslová molekula se může modifikovat takovým způsobem, že se specificky váže na receptor nebo na antigen expresovaný na selektovaném buněčném povrchu, například vázáním antismyslové molekuly nukleové kyseliny na peptid nebo protilátku, přičemž každý z nich se váže na buněčný povrchový receptor nebo na antigen. Buňky se také mohou vybavovat antismyslovou molekulou nukleové kyseliny za použití zde popsaných vektorů. Vektorové konstrukty, ve kterých je antismyslová molekula nukleové kyseliny pod kontrolou přísně prokaryotického, virového nebo euka-

riotického promotoru, včetně rostlinného promotoru, jsou výhodné pro dosažení dostatečné intracelulární koncentrace antismyslových molekul.

Podle dalšího provedení vynálezu antismyslovou molekulou nukleové kyseliny je molekula α -anomerní nukleové kyseliny. Molekula α -anomerní nukleové kyseliny vytváří specifické dvouřetězcové hybridy s komplementární RNA, řetězce jsou navzájem paralelní na rozdíl od běžných β -jednotek (Gautier a kol., Nucleic Acid Res. 15, str. 6625 až 6641, 1987). Antismyslová molekula nukleové kyseliny může zahrnovat 2'-o-methylribonukleotid (Inoue a kol., Nucleic Acid Res. 15, str. 6131 až 6148, 1987) nebo chimerní RNA-DNA analogon (Inoue a kol., FEBS Lett. 215, str. 327 až 330, 1987).

Podle dalšího provedení antismyslovou molekulou nukleové kyseliny podle vynálezu je ribozym. Ribozymy jsou katalytické RNA molekuly s ribonukleázovou aktivitou, která může štěpit jednořetězcovou nukleovou kyselinu, jako je mRNA, ke které mají komplementární region. Ribozymy, například s kladívkovou hlavou, které popsal Haselhoff a Gerlach (Nature 334, str. 585 až 591, 1988), se mohou používat pro katalytické štěpení PSE mRNA transkriptů k inhibici translace PSE mRNA. Ribozym se specificitou pro PSE kódující nukleovou kyselinu se může označovat na základě nukleotidové sekvence PSE cDNA zde popsané (to je 38° Ck21_g07wd v SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11) nebo na základě heterologové sekvence, která se má izolovat způsobem podle vynálezu. Například se může konstruovat derivát TetrahymenaL-19-IVS RNA, jehož nukleotidová sekvence aktivního místa je komplementární s nukleotidovou sekvencí, která se má odštěpit v PSE kódující mRNA (například Cech a kol., americký patentový spis číslo US 4 987071 a Cech a kol., americký patentový spis číslo US 5 116742). Nebo se může používat PSE mRNA pro selekci katalytické RNA se specifickou ribonukleázovou aktivitou ze soubo-



ru RNA molekul (Bartel D. a Szostak J.W., Science 261, str. 1411 až 1418, 1993).

Nebo se exprese PSE genu může inhibovat řízením nukleotidových sekvencí, které jsou komplementární s regulačním regionem PSE nukleotidové sekvence (například PSE promotor a/nebo zesilovač transkripce) takovým způsobem, že se vytváří trojitá šroubovicová struktura, která inhibuje transkripci PSE genu v cílových buňkách (Helene C., Anticancer Drug. Res. 6(6), str. 569 až 584, 1991; Helene C. a kol., Ann. N. Y. Acad. Sci. 660, str. 27 až 36, 1992; a Maher L.J., Bioassays 14(12), str. 807 až 815, 1992).

B. Genový konstrukt

Vynález se také týká nového genového konstruktů obsahujícího izolovanou nukleovou kyselinu odvozenou od *Physcomitrella*, *Phytophthora*, *Cryptocodium* nebo *Thraustochytrium* a kódující polypeptid, který elonguje mastné kyseliny s 16, s 18 nebo se 20 atomy uhlíku s alespoň dvěma dvojnými vazbami ve skeletu mastné kyseliny o alespoň dva atomy uhlíku, nebo který obsahuje genovou sekvenci SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO 9 a SEQ ID NO 11, její homology, deriváty nebo analogy, které se váží na jeden nebo na několik regulačních signálů s výhodou pro zvýšení genové exprese. Jako příklady takových regulačních sekvencí se uvádějí sekvence, které se váží na induktory nebo represory, a tak regulují expresi nukleové kyseliny. Tyto nové regulační sekvence, přírodní regulace těchto sekvencí před aktuálními strukturálními geny může být vždy přítomná, pokud je geneticky vhodně modifikována, takže se přírodní regulace může vypnout a exprese genu se podpoří. Genový konstrukt může mít však také jednodušší strukturu, to znamená, že se nezavádějí přídatné regulační signály dříve než sekvence SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO 9 a SEQ ID NO 11 nebo jejich ho-

mology a přírodní promotory s jejich regulací nejsou deletovány. Místo toho se mutuje přírodní regulační sekvence takovýmto způsobem, že regulace již neexistuje a genová exprese se podpoří. Genový konstruk může dále s výhodou zahrnovat jeden nebo několik tak zvaných zesilovačů transkripce sekvencí, které se funkčně vážou na promotor a které umožňují zvýšení exprese sekvence nukleové kyseliny. Je také možné přidavně začleňovat výhodné sekvence na 3' zakončení sekvencí DNA například další regulační prvky nebo terminátory. Elongázové geny mohou být obsaženy v jedné nebo v několika kopiích v genovém konstrukt. Pro inzerci dalších genů do organismu je výhodné, pokud jsou další geny obsaženy v genovém konstrukt.

Výhodné regulační sekvence pro nový proces existují například v promotorech, jako jsou *cos*, *tac*, *trp*, *tet*, *trp-ted*, *lpp*, *lac*, *lpp-lac*, *lacI^q*, *T7*, *T5*, *T3*, *gal*, *trc*, *ara*, *SP6*, λ *PR* nebo λ *PL* promotor a s výhodou se používají v gram-negativních bakteriích. Regulační sekvence dále s výhodou existují v gram-pozitivních promotorech *amy* a *SPO2*, v kvasinkových nebo v houbových promotorech *ADC1*, *MF α* , *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH*, *TEF*, *rp28*, *ADH* nebo v rostlinných promotorech *CaMV/35S* (Franck a kol., *Cell* 21, str. 285 až 294, 1980), *PRP1* (Ward a kol., *Plant. Mol. Biol.* 22, 1993), *SSU*, *OCS*, *lib4*, *usp*, *STLS1*, *B33*, *nos* nebo v ubiquitinovém nebo v phaseolinovém promotoru. V této slouvislosti jsou vhodné také indukovatelné promotory, například promotory popsané v literatuře (evropský patentový spis číslo EP-A-0 388186 (benzylsulfonamid-indukovatelný); Gatz a kol., *Plant J.* 2, str. 397 až 404, 1992 (tetracyklin-indukovatelný); evropský patentový spis číslo EP-A-0 335528 (abscisová kyselina-indukovatelná); nebo světový patentový spis číslo WO 93/21334 (ethanol- nebo cyklohexanol-indukovatelný). Jinými vhodnými rostlinnými promotory jsou cytosolická *FBPáza* nebo bramborový *ST-LSI* promotor (Stockhaus a kol., *EMBO J.* 8, str. 2445, 1989) *Glycin max* fosforibosylpyrofosfátamido-transferázový promotor (Genbank Accesion NO. U8799) nebo pro

nodus specifický promotor (popsaný v evropském patentovém spise číslo EP-A-0 249676). Zvláště výhodnými promotory jsou promotory, které umožňují expresi ve tkáních, které jsou zahrnuty v biosyntéze mastných kyselin. Mimořádně výhodné jsou pro semena specifické promotory, jako jsou promotory *usp*, *LEB4*, *faseolin* nebo *napin*. Dalšími výhodnými jsou pro semena specifické promotory, kterých se může používat jako monokotů nebo dikotů, které jsou popsány v americkém patentovém spise číslo US 5 608152 (řepky olejky *napin* promotor), ve světovém patentovém spise číslo WO 98/45461 (*Arabidopsis phaseolin* promotor), v americkém patentovém spise číslo US 5 504200 (*Phaseolus vulgaris phaseolin* promotor), ve světovém patentovém spise číslo WO 91/13980 (*Brassica BCe4*-promotor) a v další literatuře (Baeumlein a kol., *Plant J.* 2, 2, str. 233 až 239, 1992 (luštěninový *LEB4* promotor), přičemž jsou tyto promotory vhodné pro dikoty. Pro monokoty jsou vhodné například následující promotory: pro ječmen *lpt-2* nebo *lpt-1* promotor (světový patentový spis číslo WO 95/15389 a WO 95/23230), ječmenový hordeinový promotor a jiné vhodné promotory popsané ve světovém patentovém spise číslo WO 99/16890.

V podstatě je možné použít všechny přírodní promotory s jejich regulačními sekvencemi, shora zmíněnými, pro nový způsob. Je také možné a výhodné přidavně použít syntetických promotorů.

Genový konstrukt může také zahrnovat další geny, které se mají zavést do organismů. Je možné a výhodné zavádět do hostitelských organismů a expresovat v nich regulační geny, jako jsou geny pro induktory, represory a enzymy, které v důsledku své enzymatické aktivity se podílejí na regulaci jednoho nebo několika genů biosyntetické cesty. Tyto geny mohou být heterologového nebo homologového původu. Včleněné geny mohou mít svůj vlastní promotor nebo mohou být pod kontrolou promotoru sekvence SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID

NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11 nebo jejich homologů, derivátů nebo analogů.

K expresování jiných genů, které jsou obsaženy, zahrnuje genový konstrukt s výhodou další 3'- a/nebo 5'-koncové regulační sekvence pro podporu exprese a tyto sekvence jsou vybrány pro optimální expresi jako funkce vybraného hostitelského organismu a genu nebo genů.

Jak shora uvedeno, úkolem těchto regulačních sekvencí je umožnit specifickou expresi genů a expresi proteinu. V závislosti na hostitelském organismu to může například znamenat, že se gen exprese nebo nadexpresuje pouze po indukci nebo že se exprese a/nebo nadexpresuje bezprostředně.

Regulační sekvence nebo regulační faktory mohou mít výhodné působení na expresi genů, které se zavedly, a tak je podpořit. Při tomto způsobu je možné, že se regulační elementy s výhodou podporují na transkripční úrovni za použití silných transkripčních signálů, jako jsou promotory a/nebo zesilovače transkripce. Je však dále také možné podporovat translaci například zlepšením stability mRNA. Sekvence nukleové kyseliny podle vynálezu jsou s výhodou klónovány do genového konstruktů (=expresní kazeta, konstrukt nukleové kyseliny) spolu s alespoň jedním reporterovým genem a tento genový konstrukt se zavádí do organismu prostřednictvím vektoru nebo přímo do genomu. Tento reporterový gen má umožnit snadnou zjištělnost prostřednictvím zkoušek růstu, fluorescence, chemiluminescence, bioluminescence nebo resistance nebo fotometrickým měřením. Jakožto příklady reporterových genů se uvádějí geny pro resistenci k antibiotikům nebo herbicidům, hydrolázové geny, fluorescenceční proteinové geny, bioluminescenční geny, geny metabolismu cukru nebo nukleotidu nebo biosyntézní geny, jako jsou Ura3 gen, Ilv2 gen, luciferázový gen, β -galaktosidázový gen, gfp geny, 2-deoxyglukózo-6-fosfátfosfatázový

gen, β -glukuronidázový gen, β -laktamázový gen, neomycinfosfo-transferázový gen, hygromycinfosfotransferázový gen nebo gen resistance BASTA (=glufosinát). Tyto geny umožňují, aby byla transkripční aktivita a tak exprese genu snadněji měřena a kvantifikována. To umožňuje identifikaci pozic v genomu, který vykazuje odlišnou produktivitu.

Sekvence nukleové kyseliny podle vynálezu ze souboru zahrnujícího SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11, které kódují elongázy, mohou být obsaženy v expresní kazetě (= genový konstrukt) v jedné nebo v několika kopiích.

Expresní kazeta (= genový konstrukt, konstrukt nukleové kyseliny) může přídatně obsahovat alespoň jednu další nukleovou kyselinu, která kóduje gen, s výhodou z biosyntézy mastné kyseliny, aby byl zaveden do hostitelského organismu. Tyto geny mohou být odděleně regulovány nebo v témže regulačním regionu jako geny pro elongázu podle vynálezu. Tyto geny jsou například další biosyntézní geny s výhodou biosyntézy mastné kyseliny, což umožňuje zvýšenou syntézu. Příkadně se uvádějí geny pro $\Delta 19$ -, $\Delta 17$ -, $\Delta 15$ -, $\Delta 12$ -, $\Delta 9$ -, $\Delta 8$ -, $\Delta 6$ -, $\Delta 5$ -, $\Delta 4$ -desaturázu, pro různé hydroxylázy, $\Delta 12$ -acetylenázu, acyl-ACP thioesterázu, β -ketoacyl-ACP syntázu nebo pro β -ketoacyl-ACP reduktázy. Desaturázové geny jsou s výhodou používány v konstrukt nukleové kyseliny. Tyto geny opět mohou být obsaženy v genovém konstrukt v jedné nebo v několika kopiích.

C. Rekombinantní expresní vektory a hostitelské buňky

Vynález se také týká vektorů, s výhodou expresních vektorů, obsahujících nukleovou kyselinu podle vynálezu nebo genový konstrukt podle vynálezu, které kódují PSE (nebo její část). Výrazem "vektor" se zde vždy míní molekula nukleové kyseliny, která může nést jinou nukleovou kyselinu, na kterou je ligová-

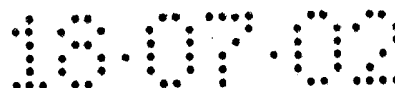
na. Jedním typem vektoru je "plasmid", který představuje okrouhlou dvouřetězcovou DNA smyčku, do které mohou být ligovány přídavné DNA segmenty. Dalším typem vektoru je virový vektor, přičemž je možné, že jsou přídavné segmenty DNA ligovány do virového genomu. Určité vektory jsou schopny autonomní replikace v hostitelské buňce, do které byly zavedeny (například bakteriální vektory s bakteriálním původem replikace a episomální savčí vektory). Jiné vektory (například episomální savčí vektory) jsou integrovány do genomu hostitelské buňky po zavedení do hostitelské buňky a tak replikovány spolu s hostitelským genomem. Různé vektory mohou řídit expresi genů, do kterých jsou funkčně vázány. Tyto vektory se označují jako "expresní vektory". Zpravidla expresní vektory, které jsou vhodné pro rekombinantní DNA techniky, mají formu plasmidů. V popísaném případě se výrazy "plasmid" a "vektor" mohou užívat zaměnitelně, jelikož je plasmid nejčastěji používanou formou vektoru. Vynález však zahrnuje tyto jiné formy expresních vektorů, například virové vektory (pro například replikaci deficientních retrovirů, adenovirů a adeno příbuzných virů), které mají podobné funkce. Výraz vektor také zahrnuje jiné vektory známé pracovníkům v oboru, jako jsou fágy, viry jako SV40, CMV, baculovirus, adenovirus, transposony, IS elementy, plasmidy, fagemidy, kosmidy, lineární nebo kruhové DNA a RNA.

Rekombinantní expresní vektory podle vynálezu zahrnují nukleovou kyselinu podle vynálezu nebo genový konstrukt podle vynálezu ve formě, která je vhodná pro expresi nukleové kyseliny v hostitelské buňce, čímž se míní, že rekombinantní expresní vektory zahrnují jednu nebo několik regulačních sekvencí, vybraných na bázi hostitelské buňky k použití pro expresi, která je nebo které jsou funkčně vázány na sekvenci nukleové kyseliny, která se má expresovat. V rekombinantním expresním vektoru, "funkčně vázaném" se míní, že je příslušná nukleotidová sekvence vázána na regulační sekvenci nebo na regulační sekvence takovým způsobem, že je možná exprese nukleo-

tidové sekvence a ty jsou navzájem vázány, takže obě sekvence splňují předurčenou funkci, která je sekvenci připisována (například ve in vitro transkripčním/translačním systému nebo v hostitelské buňce, pokud se vektor do hostitelské buňky zavede). Výraz "regulační sekvence" zahrnuje promotory, zesilovače transkripce a jiné expresní kontrolní prvky (například polyadenylační signály). Tyto regulační sekvence popsal například Goeddel (Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA, 1990) nebo Gruber a Crosby (Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, Florida, vyd.: Glick and Thompson, kapitola 7, str. 89 až 108 a připojená literatura). Regulační sekvence zahrnují sekvence, které řídí konstitutivní expresi nukleotidové sekvence v četných typech hostitelských buněk a které řídí přímou expresi nukleotidové sekvence pouze v určitých hostitelských buňkách za určitých podmínek. Pracovníkům v oboru je známo, že konstrukce expresního vektoru může záviset na četných faktorech, jako jsou například volba hostitelské buňky, která se má transformovat, a rozsah, kterým se žádaný protein expresuje. Expresní vektor podle vynálezu se může zavádět do hostitelské buňky za účelem produkce proteinů nebo peptidů, včetně fúzních proteinů nebo fúzních peptidů, které se kódují nukleovými kyselinami, jak je zde popsáno (například PSE, mutantové formy PSE a fúzní proteiny). Rekombinantní expresní vektory podle vynálezu mohou být určeny pro expresi PSE v prokaryotických nebo eukaryotických buňkách. Například se PSE geny mohou expresovat v bakteriálních buňkách, například *C. glutamicum*, ve hmyzích buňkách (za použití baculovirových expresních vektorů), v kvasnicích a v jiných houbových buňkách (Romanos M.A. a kol., "Foreign gene expression in yeast: a review", *Yeast* 8, str. 423 až 488, 1992; van den Hondel C.A.M. J.J. a kol., "Heterologous gene expression in filamentous fungi", *More Gene Manipulations in Fungi*, J.W. Bennet & L.L. LaSurre, vyd., str. 396 až 428: Academic Press: San Diego, 1991; van den Hondel C.A.M.J.J. & Punt P.J., "Gene transfer systems

and vector development for filamentous fungi", Applied Molecular Genetics of Fungi, Peberdy J.F. a kol., vyd. str. 1 až 28, Cambridge University Press: Cambridge, 1991) v řasách (Falciatore a kol., Marine Biotechnology 1, 3, str. 239 až 251, 1999), v ciliátech následujících typů: Holotrichia, Spirotrichia, Peritrichia, Suctorina, Tetrahymena, Paramecium, Colpidium, Glaucocystis, Platyophrya, Potomacoccus, Pseudocohnilembus, Euplotes, Engelmanniella a Stylonychia, zvláště rodu Stylonychia lemnae, za použití vektorů a následujících transformačních způsobů popsaných ve světovém patentovém spise číslo WO 98/01572 a buněk mnohobuněčných rostlin (Schmidt R. a Willmitzer L., "High efficiency Agrobacterium tumefaciens-mediated Transformation of Arabidopsis thaliana leaf and cotyledon explants", Plant Cell Rep., str. 583 až 586, 1988; Plant Molecular Biology and Biotechnology, C Press, Boca Raton, Florida, kapitola 6/7, str. 71 až 119, 1993; F.F. White, B. Jenes a kol., "Techniques for Gene Transfer", Transgenic Plants, svazek 1, Engineering and Utilization, vyd.: Kung a R. Wu, Academic Press, str. 128 až 143, 1993; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42, str. 205 až 225, 1991 a připojené odkazy na literaturu) nebo v savčích buňkách. Vhodné hostitelské buňky popsal také Goeddel (Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA, 1990). Jako alternativa se rekombinantní expresní vektor může transkribovat a translatovat in vitro, například za použití T7 promotorové regulační sekvence a T7 polymerázy.

V prokaryotech se proteiny zpravidla expresují za použití vektorů obsahujících konstitutivní nebo zaveditelné promotory, které řídí expresi fúzních proteinů nebo nefúzních proteinů. Fúzní vektory přidávají řadu aminokyselin do kódovaného proteinu, zpravidla na aminozakončení rekombinantního proteinu, avšak také na C zakončení, nebo fúzují se vhodnými regiony v proteinech. Tyto fúzní vektory mají zpravidla tři účely: 1) podporují expresi rekombinantního proteinu, 2) zvyšují solubi-



litu rekombinantního proteinu, 3) doporučují čištění rekombinantního proteinu působením jako ligand v afinitním čištění, například prostřednictvím tak zvaných his konečků. V případě fúzních expresních vektorů se často zavádí místo proteolytického štěpení v místě, kde jsou vázány, fúzní jednotka a rekombinantní protein, takže se rekombinantní protein může oddělit od fúzní jednotky po čištění fúzního proteinu. Tyto enzymy a jejich odpovídající rozpoznávací sekvence zahrnují faktor Xa, thrombin a enterokinázu.

Jakožto typické expresní vektory se příkladně uvádějí pGEX (Pharmacia Biotech Inc., Smith D.B. a Johnson K.S., Gene 67, str. 31 až 40, 1988), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) a pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), přičemž je glutathion S-transferáza (GST), maltóza-E-vázací protein nebo protein A fúzován na rekombinantní cílový protein. Podle jednoho provedení je PSE kódující vektor klónován do pGES expresního vektoru pro generaci vektoru kódujícího fúzní protein, který zahrnuje od N-zakončení do C zakončení GRT-thrombin štěpicí místo-X-protein. Fúzní protein se může čistit afinitní chromatografií za použití glutathion agarové pryskyřice. Rekombinantní PSE, který není fúzován s GST, se může získat štěpením fúzního proteinu thrombinem.

Jakožto příklady indukovatelného nefúzních E.coli expresních vektorů se uvádějí pTrc (Amann a kol., Gene 69, str. 301 až 315, 1988) a pET 11d (Studier a kol., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California, str. 60 až 89, 1990). Štítová genová exprese pTrc vektoru je založena na transkripci hostitelské RNA polymerázy z hybridního trp-lac fúzního promotoru. Cílová genová exprese z pET 11d vektoru je založena na transkripci z T7-gn10-lac fúzního promotoru, který je zprostředkován koexpresní virovou RNA polymerázou (T7 gnl). Tato virová polymeráza je vybavena hostitelskými kmeny BL21 (DE3) a/nebo HMS174 (DE3)

rezidentním profágem, který uchovává T7 gnl gen za transkripční kontroly lacUV5 promotoru.

Jiné vektory, které jsou vhodné pro prokaryotické organizmy jsou pracovníkům v oboru známy: jakožto tyto vektory se příkladně uvádějí v *E. coli* pLG338, pACYC184, pBR série jako pBR322, PUC série jako PUC18 nebo PUC19, M13mp série, pKC30, pRep4, PHS1, PHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III¹¹³-B1, pgt11 nebo pBdCI, ve *Streptomyces* pIJ101, pIJ364, pIJ702, pIJ361, v *Bacillu* PUB110, pC194 nebo pBD214, v *Corynebacterium* pSA77 nebo pAJ667.

Strategií maximalizace exprese rekombinantního proteinu je expresovat protein v hostitelské bakterii, jejíž schopnost štěpit rekombinantní protein proteolyticky je narušena (Gotesman S., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California, str. 119 až 128, 1990). Další strategií je modifikovat sekvenci nukleové kyseliny, která se má zavést sekvencí nukleové kyseliny do expresního vektoru, takže jednotlivými kodony pro každou aminokyselinu jsou kodony, které se s výhodou používají v bakterii vybrané pro expresi, například *C. glutamicum* (Wada a kol., *Nucleic Acid Res.* 20, str. 2111 až 2118, 1992). Modifikace těchto sekvencí nukleové kyseliny podle vynálezu se provádí o sobě známými způsoby pro syntézu DNA.

Vynález se také týká PSE expresního vektoru, kterým je kvasinkový expresní vektor. Jako příklady vektorů pro expresi do kvasinek *S. cerevisiae* se uvádějí pYepSecl (Baldari a kol., *Embo J.* 6, str. 229 až 234, 1987), pMFa (Kurjan a Herskowitz, *Cell* 30, str. 933 až 943, 1982), pJRY88 (Schultz a kol., *Gene* 54, str. 113 až 123, 1987) a pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektory a způsoby pro konstrukci vektorů, které jsou vhodné pro použití v jiných houbách, jako jsou filamentní houby, které podrobně popsal van den Hondel C.A.M.J.J.

& Punt P.J. ("Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi", Applied Molecular Genetics of Fungi, Peberdy J.F. a kol., vyd. str. 1 až 28, Cambridge University Press: Cambridge, 1991) nebo J.W. Bennet & L.L. Lasure (More Gene Manipulations in Fungi, str. 396 až 428, Academic Press: San Diego). Dalšími vhodnými kvasinkovými vektory jsou například pAG-1, YEp6, YEp13 nebo pEMBLye23.

Nebo se PSE podle vynálezu může expresovat ve hmyzích buňkách, za použití baculovirových expresních vektorů. Baculovirové vektory, které jsou vhodné pro expresní proteiny v kultuře hmyzích buněk (například buněk Sf9) zahrnují pAc série (Smith a kol., Mol. Cell Biol. 3, str. 2156 až 2165, 1983) a pVL série (Lucklow a Summers, Virology, 170, str. 31 až 39, 1989).

Shora uvedené vektory jsou krátkým přehledem možných vhodných vektorů. Pracovníkům v oboru jsou známy další plasmidy a jsou popsány v literatuře (například Cloning Vectors, (vyd.) Pouwels P.H. a kol., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, ISBN 0 444 904018, 1985).

Podle ještě dalšího provedení nukleová kyselina podle vynálezu se expresuje v savčích buňkách za použití savčího expresního vektoru. Jakožto příklady savčích expresních vektorů se uvádějí pCDM8 (Seed B, Nature 329, str. 840, 1987) a pMT2PC (Kaufman a kol., EMBO J. 6, str. 187 až 195, 1987). Při použití v savčích buňkách kontrolní funkce expresního vektoru jsou často vybaveny virovými regulačními elementy. Promotory, které se obvykle používají, jsou odvozeny například od polyoma, adenoviru2, cytomegaloviru a opičího viru 40. Jiné vhodné expresní systémy pro prokaryotické a eukaryotické buňky jsou popsány v literatuře (kapitola 16 a 17, Sambrook J., Fritsch E.F. a Maniatis T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor

Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

Podle jiného provedení vynálezu může rekombinantní savčí expresní vektor řídit expresi nukleové kyseliny s výhodou ve specifickém buněčném typu (například pro tkáň specifické regulační elementy pro expresi nukleové kyseliny. Pro tkáň specifické regulační elementy jsou v oboru známy. Jakožto příklady, tedy nikoliv jako jakékoliv omezení, vhodných pro tkáň specifických regulačních promotorů se uvádějí albuminový promotor (specifický pro játra, Pinkert a kol., Genes Dev. 1, str. 268 až 277, 1987), lymfoidní specifické promotory (Calame a Eaton, Adv. Immunol. 43, str. 235 až 275, 1988), zvláště promotory T-buněčných receptorů (Winoto a Baltimore, Embo J. 8, str. 729 až 733, 1989) a imunoglobuliny (Banerji a kol., Cell 33, str. 729 až 740, 1983; Qeen a Baltimore, Cell 33, str. 741 až 748, 1983), neuron-specifické promotory (například neurofilamentový promotor; Byrne a Ruddle, PNAS 86, str. 5473 až 5477, 1989), pro pankreas specifické promotory (Edlund a kol., Science 230, str. 912 až 916, 1985) a pro prsní žlázu specifické promotory (například mléčné sérové promotory; americký patentový spis číslo US 4 873316 a evropský patentový spis EP-A-0 264166). Zahrnuty jsou promotory regulující vývoj, například muší hox promotory (Kessel a Gruss, Science 249, str. 374 až 379, 1990) a fetoproteinový promotor (Campes a Tilghman, Genes Dev. 3, str. 537 až 546, 1989).

Podle dalšího provedení vynálezu PSE podle vynálezu mohou být expresovány jednobuněčné rostlinné buňky (například řasy) (Falciatore a kol., Marine Biotechnology 1(3), str. 239 až 251, 1999 a připojené odkazy na literaturu) a rostlinné buňky z vyšších rostlin (například spermatophyty jako jsou plodiny). Jakožto příklady rostlinných expresních vektorů se uvádějí expresní vetory podrobně popsané v literatuře (Becker D., Kemper E., Schell J. a Masterson R. ("New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border",

Plant Mol. Biol. 20, str. 1195 až 1197, 1992; Bevan M.W., Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", Nucl. Acid Res. 12, str. 8711 až 8721, 1984; Vectors for Gene Transfer in Higher Plants, Transgenic Plants, svazek 1, Engineering and Utilization, vyd. Kung a R. Wu, Academic Press, str. 15 až 38, 1993). Další vhodné rostlinné vektory jsou popsány v literatuře (například "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), kapitola 6/7, str. 77 až 119, 1993). Výhodnými vektory jsou tak zvané kyvadlové vektory nebo binární vektory, které se replikují v *E. coli* a v *Agrobacteriu*.

Rostlinná expresní kazeta s výhodou obsahuje regulační sekvence, které řídí genovou expresi v rostlinných buňkách a které jsou funkčně vázány, takže každá sekvence může plnit svoji funkci, jako například transkripční ukončení, například polyadenylačních signálů. Výhodnými polyadenylačními signály jsou signály odvozené od organismu *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA jako gen 3 nebo Ti plasmid pTIACH5, který je znám jako oktopinsyntáza (Gielen a kol., EMBO J. 3, od str. 835, 1984) nebo její funkční ekvivalent, jsou však vhodné také jiné terminátory, které jsou funkčně aktivní v rostlinách.

Jelikož rostlinná genová exprese je velmi často neomezená na transkripční úroveň, obsahuje rostlinná expresní kazeta s výhodou jiné funkčně vázané sekvence, například zesilovač translace, například nadprodukční sekvenci, která obsahuje vedoucí sekvenci 5'-netranslatovaného viru tabákové mozaiky viru, který zvyšuje poměr protein/RNA (Gallie a kol., Nucl. Acids Research 15, str. 8693 až 8711, 1987).

Expresce rostlinného genu musí být funkčně vázána na vhodný promotor, který ovlivňuje genovou expresi specifickým způsobem pro buňku nebo pro tkáň s přesným načasováním. Výhodnými jsou promotory, které vedou ke konstitutivní expresi (Benfey a kol., EMBO J. 8, str. 2195 až 2202, 1989), například odvozené

z rostlinných virů, jako je 35S CAMV (Franck a kol., Cell 21, str. 285 až 294, 1980), 19S CaMV (také americký patentový spis číslo US 5 352605 a světový patentový spis číslo WO 84/02913) nebo rostlinné promotory jako Rubisco malý podjednotkový promotor (americký patentový spis číslo US 4 962028).

Jinými sekvencemi, které jsou výhodné pro funkční vázání v rostlinných genových expresních kazetách, jsou cílové sekvence, které jsou potřebné pro zacílení genového produktu do jeho odpovídajícího buněčného prostoru (pro přehled Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4, str. 285 až 423, 1996 a uvedené odkazy na literaturu) například do vakuoly, do jádra, do všech typů plastidů jako jsou amyloplasty, chloroplasty, chromoplasty, extracelulární oblast, mitochondrie, endoplasmové reticulum, elaioplasty, peroxisomy a do jiných prostorů v rostlinných buňkách.

Rostlinná genová exprese se také může usnadňovat chemicky indukovatelnými promotory (pro přehled Gatz, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48, str. 89 až 108, 1997). Chemicky indukovatelné promotory jsou zvláště vhodné, jestliže je žádoucí, aby genová exprese probíhala specifickým způsobem se zřetelem na načasování. Jakožto příklady takových promotorů se uvádějí salicylovou kyselinou indukovatelný promotor (světový patentový spis číslo WO 95/19443), tetracyklinem indukovatelný promotor (Gatz a kol., Plant J. 2, str. 397 až 404, 1992) a ethanolem indukovatelný promotor.

Jinými vhodnými promotory jsou promotory, které odpovídají biotickým nebo abiotickým stresovým podmínkám, například patogenem indukovaný PRP1 genový promotor (Ward a kol., Plant. Mol. Biol. 22, str. 361 až 366, 1993), tepelně indukovatelný rajčatový α -amylázový hsp80 promotor (americký patentový spis číslo US 5 187267), nízkotepečně indukovatelný bramborový α -amylázový promotor (světový patentový spis číslo WO 96/12814)

nebo poraněním indukovatelný pinII promotor (evropský patentový spis číslo EP-A-0 375091).

Obzvláště výhodnými jsou promotory, které vedou ke genové expresi v tkáních a v orgánech, ve kterých dochází k biosyntéze lipidů a oleje, v rostlinných buňkách, jako jsou endospermové buňky, a v buňkách vyvíjejícího se embrya. Jakožto vhodné promotory se uvádějí řepkové napínavé genové promotory (americký patentový spis číslo US 5 608152), promotor *Vicia faba* USP (Baeumlein a kol., *Mol Gen Genet*, 225 (3), str. 459 až 467, 1991), promotor *Arabidopsis oleosin* (světový patentový spis číslo WO 98/45461), promotor *Phaseolus vulgaris phaseolin* (americký patentový spis číslo US 5 504200), promotor *Brassica Bce4* (světový patentový spis číslo WO 91/13980) nebo luštěninový B4 promotor (LeB4; Baeumlein a kol., *Plant Journal* 2(2), str. 233 až 239, 1992) a promotory, které vedou k semenové specifické expresi v jednoděložných, jako jsou například kukuřice, ječmen, pšenice, žito, rýže. Významnými vhodnými promotory jsou ječmenný lpt2 nebo lpt1 genový promotor (světový patentový spis číslo WO 95/15389 a WO 95/23230) nebo promotory popsané ve světovém patentovém spise číslo WO 99/16890 (promotory z ječmenného hordeinového genu, z rýžového glutelinového genu, z rýžového orizinového genu, z rýžového prolaminového genu, ze pšeničného gliadinového genu, ze pšeničného glutelinového genu, z kukuřičného zeinového genu, z ovesného flutelinového genu, z čirokového kasirinového genu a z žitného secalinového genu).

Obzvláště vhodnými jsou také promotory, které vedou k plastidové specifické expresi, jelikož plastidy jsou prostory, ve kterých se syntetizují prekurzory a některé konečné produkty lipidové biosyntézy. Vhodné promotory, například promotor polymerázy virové RNA, jsou popsány ve světovém patentovém spise číslo WO 95/16783 a WO 97/06250 a *Arabidopsis clpP* promotor je popsán ve světovém patentovém spise číslo WO 99/46394.

Vynález se také týká rekombinantního expresního vektoru zahrnujícího DNA molekulu podle vynálezu, která se klónuje do expresního vektoru v antismyslové orientaci, to je DNA molekula se funkčně váže na regulační sekvenci tak, že umožňuje expresi (transkripcí DNA molekuly) RNA molekuly, která je "antismyslová" ke PSE mRNA. Mohou se volit regulační sekvence, které jsou funkčně vázány na nukleovou kyselinu klónovanou do antismyslové orientace a které řídí kontinuální expresi antismyslové RNA molekuly v multiplicitě buněčných typů, například virové promotory a/nebo zesilovače nebo se mohou volit regulační sekvence, které řídí konstitutivní, pro tkáň specifickou nebo pro buňku specifickou expresi antismyslové RNA. Antismyslový expresní vektor může být obsažen ve formě rekombinantního plasmidu, fágemidu nebo zeslabeného viru, ve kterých se antismyslové nukleové kyseliny produkují za řízení vysoce účinného regulačního regionu, jehož aktivita se může stanovit podle buněčného typu, do něhož se má zavádět vektor. V literatuře je vysvětlení regulace genové exprese prostřednictvím antismyslových genů (Wintraub H. a kol., Antisense-RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews - Trends in Genetics, svazek 1(1), 1986).

Vynález se také týká hostitelských buněk, do kterých se zavádí rekombinantní expresní vektor podle vynálezu. Výrazy "hostitelská buňka" a "rekombinantní hostitelská buňka" se zde vždy používají zaměnitelně. Přirozeně se tyto výrazy týkají nejen zvláštní cílové buňky ale také progenu nebo potenciálního progenu této buňky. Jelikož může docházet ke specifickým modifikacím v následných generacích se zřetelem na mutace nebo na působení okolí, nejsou tyto progeny nutně identické s mateřskou buňkou, avšak nevybočují z rozsahu používaného podle vynálezu.

Hostitelskou buňkou může být prokaryotická nebo eukaryotická buňka. Například se může PSE expresovat v bakteriálních

buňkách, jako jsou *C. glutamicum*, hmyzí buňky, houbové buňky nebo savčí buňky (například vaječnickové buňky čínského křečka [Chinese hamster ovary] CHO nebo COS buňky), řasy, ciliates, rostlinné buňky, houby nebo jiné mikroorganismy, jako je *C. glutamicum*. Další hostitelské buňky jsou známy pracovníkům v oboru.

Vektor DNA se může zavádět do prokaryotických nebo do eukaryotických buněk o sobě známými transformačními nebo transfekčními způsoby. Zde používané výrazy "transformace" a "transfekce", konjugace a transdukce zahrnují souhrn známých způsobů v oboru pro zavádění cizí nukleové kyseliny (například DNA) do hostitelské buňky, včetně kalciumfosfátové nebo kalciumchloridové koprecipitace, DEAE-dextranem zprostředkovaného transfekce, lipofekce, přírodní kompetence, chemicky zprostředkovaného transferu, elektroporace nebo bombardování částicemi. Způsoby pro transformaci nebo transfekci hostitelských buněk, včetně rostlinných buněk popsal Sambrook J. a kol. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) a jak je popsáno v dalších laboratorních příručkách (například Methods in Molecular Biology, svazek 44, Agrobacterium protocols, vyd. Gartland and Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey, 1995).

O stabilních transfekčních savčích buňkách je známo, že pouze minorita těchto buněk integruje cizí DNA do svého genomu v závislosti na použitém expresním vektoru a na použité transfekční technice. K identifikaci a selekci těchto integrantů gen, který kóduje selektovatelný signální znak (=marker) (například odolnosti k antibiotikům) se zpravidla zavádí do hostitelských buněk spolu s příslušným genem. Výhodné selektovatelné markery zahrnují markery, které dodávají odolnost k drogám, jako je G418, hygromycin a methotrexát nebo v rostlinách zahrnují markery, které dodávají odolnost proti herbicidům, ja-

ko je glyfosfát nebo glufosinát. Vhodnými markery jsou například markery signální znaky, které kódují geny, které jsou zahrnuty v biosyntézním pochodu, například cukry nebo aminokyseliny, jako je β -galaktosidáza, *ura3* nebo *ilv2*. Markery, které kódují geny, jako jsou luciferáza, *gfp* nebo jiné fluorescenční geny, jsou rovněž vhodné. Tyto markery se mohou používat v mutantech, ve kterých tyto geny nejsou funkční, jelikož byly deletovány například o sobě známými způsoby. Dále se mohou zavádět markery, které kódují nukleovou kyselinu, která kóduje selektovatelný signální znak do hostitelské buňky na tentýž vektor, jako je vektor, který kóduje PSE nebo se mohou zavádět na separátní vektor. Buňky, které byly stabilně transfektovány zavedenou nukleovou kyselinou, se mohou identifikovat například drogovou selekcí (například buňky, které mají integrovaný selektovatelný marker přežívají, zatímco ostatní buňky umírají).

Pro generaci homologově rekombinantního mikroorganismu se generuje vektor, který obsahuje alespoň jeden segment PSE genu, do kterého se zavedla delece, adice nebo substituce k modifikaci PSE genu a tím například k narušení funkčnosti. PSE genem je s výhodou *Physcomitrella*, *Phytophthora*, *Cryptocodium*, nebo *Thraustochytrium* PSE gen, může se však také použít homolog nebo analog z jiných organismů, dokonce i ze savčích, z houbových nebo ze hmyzích zdrojů. Podle výhodného provedení je vektor konstruován tak, aby byl endogenní PSE gen funkčně narušen (to je, aby již nekódoval funkční protein, také ukončený knock-out vektor) po homologové rekombinaci. Nebo se vektor může konstruovat tak, že endogenní PSE geny se mutují nebo se modifikují jinak po homologové rekombinaci za stále zakódovaného funkčního proteinu (například protisměrový regulační region může být modifikován tak, že vede k modifikaci exprese endogenní PSE). Ke generaci bodu mutace cestou homologové rekombinace se rovněž mohou použít DNA-RNA hybridy, které jsou rovněž známy jako chimeroplasty a které popsal Cole-Strauss a kol. (Nucleic Acid Research 27(5), str. 1323 až 1330, 1999; a

Kmiec, Gene Therapy, American Scientist, 87(3), str. 240 až 247, 1999).

Vektor pro homologové rekombinace, modifikovaný segment PSE genu je lemován na svém 5' a 3' zakončení přídatnou nukleovou kyselinou PSE genu, takže je možná homologová rekombinace mezi exogenním PSE genem, který je obsažen na vektoru a endogenním PSE genem v mikroorganismu nebo v rostlině. Přídatná lemuující PSE nukleová kyselina je dostatečně dlouhá pro úspěšnou homologovou rekombinaci s endogenním genem. Zpravidla několik stovek párů bází až kilobáze lemuující DNA (jak na 5' tak na 3' zakončení) jsou obsaženy ve vektoru (deskripci vektorů pro homologovou rekombinaci popsal Thomas K.R. a Cepecchi M.R., Cell 51, str. 503, 1987; nebo rekombinaci *Physcomitrella patens* na cDNA bázi popsal Strepp a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(8), str. 4368 až 4373, 1998). Vektor se zavádí do mikroorganismu nebo do rostlinné buňky (například prostřednictvím polyethylenglykolem zprostředkované DNA) a buňky, do kterých je PSE gen zaveden, podléhají homologové rekombinaci s endogenním PSE genem a jsou selektovány o sobě známými způsoby v oboru.

Podle jednoho provedení vynálezu se generuje rekombinantní organismus, například mikroorganismus rostlin, který obsahuje selektované systémy, které umožňují regulovat expresi zavedeného genu. Inkluze PSE genu do vektoru, když je uveden pod kontrolu lac-operonu, umožňuje například expresi PSE genu jen v přítomnosti IPTG. Tyto regulační systémy jsou v oboru známy.

Hostitelská buňka podle vynálezu, například prokaryotická nebo eukaryotická hostitelská buňka, rostoucí buď v kultivačním prostředí nebo na poli, se může použít pro produkci (to je expresi) PSE. V rostlinách alternativní způsob se může přídatně použít přímým transferováním DNA do vyvíjejících se kvě-

tů elektroporací nebo *Agrobacterium* zprostředkovaného genového přenosu. Vynález se proto také týká způsobu produkce PSE za použití hostitelských buněk podle vynálezu. Podle jednoho provedení zahrnuje způsob růst hostitelské buňky podle vynálezu (do které rekombinantní expresní vektor kódující PSE byl zaveden nebo do jejíhož genomu gen kódující divoký typ nebo modifikovaná PSE byly zavedeny) je vhodným prostředím, pokud se má produkovat PSE. Podle dalšího provedení zahrnuje způsob izolaci PSE ze prostředí nebo z hostitelské buňky.

Hostitelské buňky, které jsou v podstatě vhodné pro přijímání nukleové kyseliny podle vynálezu, nový genový produkt podle vynálezu nebo vektor podle vynálezu jsou vždy prokaryotické nebo eukaryotické organizmy. Hostitelské organizmy, kterých se s výhodou používá, jsou organizmy jako bakterie, houby, kvasinky, živočišné buňky nebo rostlinné buňky. Dalšími výhodnými organizmy jsou živočichové, s výhodou rostliny nebo jejich části. Výraz "živočich" v tomto případě nezahrnuje lidi. S výhodou se používají houby, kvasinky nebo rostliny, zvláště s výhodou houby nebo rostliny a především rostliny, jako jsou olejniny, které obsahují velké množství lipidových sloučenin, jako jsou řepka olejka, pupalka dvouletá, rostlina ricinového oleje, canola, podzemnice, lněné semínko, soja, světlice, slunečnice, brutnák lékařský, olejová palma, kokosová palma nebo rostliny, jako jsou kukuřice, pšenice, žito, oves, triticales, rýže, ječmen, bavlník, cassava, pepř, akasmitník, rostliny Solanaceae, jako jsou brambory, tabák, lilek a rajče, *Vicia species*, hrách, vojtěška, keřovité rostliny (káva, kakao, čaj), *Salix species*, stromy (olejová palma, kokosová palma) a trvalé trávy a píce. Obzvláště výhodnými rostlinami pro účely vynálezu jsou soja, podzemnice, řepka olejka, canola, rostlina ricinového oleje, lněné semínko, pupalka dvouletá, slunečnice, světlice a stromy (olejová palma a kokosová palma).

Obzvláště s výhodou se vynález týká rostlinných buněk, které obsahují polynukleotid podle vynálezu nebo vektor podle vynálezu. Přednost se dále dává transgenickým rostlinám nebo rostlinné tkáni, která obsahuje rostlinnou buňku podle vynálezu. Vynález se dále týká těch částí rostlin pro účely vynálezu, které se mohou sklízet a materiálu vhodného pro propagaci transgenních rostlin podle vynálezu, obsahujících buď rostlinné buňky podle vynálezu, které expresují nukleovou kyselinu podle vynálezu nebo obsahujících buňky, které mají zvýšenou zvýšený obsah proteinu podle vynálezu. V zásadě se mohou sklízet všechny části rostlin, zvláště například květy, pyl, plody, semenáčky, kořeny, listy, semena, hlízy a stonky. Propagační materiál zahrnuje například semena, plody, semenáčky, hlízy, řízky a rhizomy.

D. Izolovaná PSE

Vynález se také týká izolovaných PSE a jejich biologicky aktivních částí. "Izolovaný" nebo "čištěný" protein nebo jeho biologicky aktivní část je v podstatě prostý buněčného materiálu, pokud je produkován rekombinantními DNA způsoby, nebo je prostý prekurzorů nebo jiných chemikálií, pokud je syntetizován chemicky. Výraz "v podstatě prostý buněčného materiálu" zahrnuje PSE preparáty, ve kterých je protein oddělen od buněčných složek buněk, ve kterých se vyprodukoval přírodně nebo rekombinantně. Podle jednoho provedení vynálezu zahrnuje výraz "v podstatě prostý buněčného materiálu" PSE preparáty s méně než přibližně 30 % (vztaženo na suchou hmotnost) ne-PSE (označované zde také jako "znečišťující protein") výhodněji méně než přibližně 20 % ne-PSE a ještě výhodněji méně než přibližně 10 % ne-PSE a zcela přednostně méně než přibližně 5 % ne-PSE. Jestliže se PSE nebo její biologicky aktivní část produkuje rekombinantní technologií, je také v podstatě prostá kultivačního prostředí, to znamená, že kultivační prostředí je obsaženo v množství menším než přibližně 20 %, výhodněji menším

než přibližně 10 % a ještě výhodněji ménším než přibližně 5 %, vztaženo na objem preparátu. Výraz "v podstatě prostý prekurzorů a jiných chemikálií" zahrnuje PSE preparáty, ve kterých je protein oddělen od chemických prekurzorů nebo jiných chemikálií, kterých se používá při syntéze proteinu. Podle jednoho provedení vynálezu výraz "v podstatě prostý prekurzorů a jiných chemikálií" zahrnuje PSE preparáty, obsahující méně než přibližně 30 % (vztaženo na suchou hmotnost) chemických prekurzorů nebo ne-PSE chemikálií, výhodněji méně než přibližně 20 % chemických prekurzorů nebo ne-PSE chemikálií a ještě výhodněji méně než přibližně 10 % chemických prekurzorů nebo ne-PSE chemikálií, a zcela přednostně méně než přibližně 5 % chemických prekurzorů nebo ne-PSE chemikálií. Podle výhodného provedení izolované proteiny nebo jejich biologicky aktivní části neobsahují žádné znečišťující proteiny ze stejného organismu, ze kterého PSE pochází. V případě proteinu podle vynálezu, který obsahuje sekvenci uvedenou v SEQ ID NO:10 nebo které jsou kódovány genem, který obsahuje SEQ ID NO:9, se počítá s tím, že sekvence startuje se dvěma Met. Při translaci odpovídající kódující sekvence nukleové kyseliny to může vést k expresi dvou derivátů proteinu podle vynálezu za startování s prvním nebo se druhým Met. Expresní míra mezi dvěma deriváty může kolísat mezi 0 a 1 v závislosti na typu exprese nebo hostitelského organismu. Vynález zahrnuje PSE obsahující oba zmíněné deriváty, nebo pouze jeden z těchto derivátů. Oba deriváty mohou mít například odlišné aktivity, lokalizace, poločas a regulační mechanismy. Tyto proteiny se zpravidla produkují rekombinantní expresí, například PSE organismů *Physcomitrella*, *Phytophthora*, *Cryptocodium* nebo *Thraustochytrium* v rostlinách, jako je *Physcomitrella patens*, nebo ve shora uvedených rostlinách nebo v mikroorganismech, jako jsou například bakterie jako *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *C. glutamicum*, v houkách, jako jsou *Mortierella*, ve kvasínkách jako jsou *Saccharomyces* nebo v ciliátech, jako je *Colpidium* nebo v řascách, jako je *Phaeodactylum*.

Izolované PSE podle vynálezu nebo jejich části se také mohou podílet na metabolismu požadovaných sloučenin pro syntézu buněčných membrán v organizmech *Physcomitrella*, *Phytophthora*, *Crypthecodinium* nebo *Thraustochytrium* nebo na transportu molekul těmito membránami. Podle výhodného provedení zahrnuje protein nebo jeho část aminokyselinovou sekvenci, která má dostatečnou homologii s aminokyselinovou sekvencí ze souboru zahrnujícího SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12 pro protein nebo jeho část k udržení schopnosti podílet se na metabolismu sloučenin potřebných pro syntézu buněčných membrán v organizmech *Physcomitrella*, *Phytophthora*, *Crypthecodinium* nebo *Thraustochytrium* nebo na transportu molekul těmito membránami. Částí proteinu je s výhodou biologicky aktivní část zde popisovaná. Podle dalšího výhodného provedení vynálezu má PSE podle vynálezu jednu z aminokyselinových sekvencí ze souboru zahrnujícího SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12. Podle dalšího výhodného provedení vynálezu má PSE aminokyselinovou sekvenci, která je zakódovaná nukleotidovou sekvencí, která hybridizuje s nukleotidovou sekvencí SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11, například za přísných podmínek. Podle ještě dalšího výhodného provedení vynálezu má PSE aminokyselinovou sekvenci, která je zakódovaná nukleotidovou sekvencí, která má alespoň přibližně 50% až 60%, s výhodou alespoň 60% až 70%, ještě výhodněji alespoň přibližně 70% až 80%, 80% až 90% nebo 90% až 95% a ještě výhodněji alespoň přibližně 96%, 97%, 98%, 99% nebo vyšší homologii s jednou z aminokyselinových sekvencí ze souboru zahrnujícího SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12. Výhodná PSE podle vynálezu obsahuje s výhodou také alespoň jednu ze zde popisovaných PSE aktivit. Například zahrnuje výhodná PSE podle vynálezu aminokyselinovou sekvenci kódovanou nukleotidovou sekvencí, která hybridizuje se nukleotidovou sekvencí ze souboru zahrnujícího SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ

ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11, například za přísných podmínek a která se může podílet se na metabolismu sloučenin potřebných pro syntézu buněčných membrán v organizmech Physcomitrella, Phytophthora, Crypthecodinium nebo Thraustochytrium nebo na transportu molekul těmito membránami a je schopná elongovat jednu nebo několik polynenasycených mastných kyselin s alespoň dvěma dvojnými vazbami a řetězcem obsahujícím 16 nebo 18 atomy uhlíku.

Podle dalšího provedení vynálezu je PSE v podstatě homologová s aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12 a podržuje si funkční aktivity proteinu jedné ze sekvencí zahrnující SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12, jejichž aminokyselinová sekvence se liší se zřetelem na přírodní variaci nebo mutagenézi, jak je shora podrobně popsáno v subsekcí I. Podle dalšího provedení vynálezu je PSE proteinem, který obsahuje aminokyselinovou sekvenci, která má alespoň přibližně 50% až 60%, s výhodou alespoň přibližně 60% až 70%, ještě výhodněji alespoň přibližně 70% až 80%, 80% až 90% nebo 90% až 95% a ještě výhodněji alespoň přibližně 96%, 97%, 98%, 99% nebo vyšší homologii s kompletní aminokyselinovou sekvencí ze souboru zahrnujícího SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12 a má alespoň jednu ze zde popisovaných PSE aktivit. Podle dalšího provedení se vynález týká kompletního proteinu organismu Physcomitrella, Phytophthora, Crypthecodinium nebo Thraustochytrium, který je v podstatě homologový s kompletní aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12.

Biologicky aktivní část PSE zahrnuje peptidy, které zahrnují aminokyselinovou sekvenci odvozenou od aminokyselinové sekvence PSE, například aminokyselinovou sekvenci ze souboru zahrnujícího SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID

NO:8, SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:12 nebo aminokyselinovou sekvencí proteinu, který je homologový se PSE, jehož peptidy mají méně aminokyselin než PSE plné délky nebo protein plné délky, který je homologový se PSE a mají alespoň jednu aktivitu PSE. Biologicky aktivní části (peptidy, například peptidy s délkou například 5, 10, 15, 20, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50, 100 nebo více aminokyselin) obsahují zpravidla doménu nebo motiv s alespoň jednou aktivitou PSE. Kromě toho jiné biologicky aktivní části, ve kterých jsou jiné regiony proteinu deletovány, se mohou generovat rekombinantními technikami a studovat se zřetelem na jednu nebo na několik zde popisovaných aktivit. Biologicky aktivní části PSE s výhodou zahrnují jednu nebo několik vybraných domén/motivů nebo jejich částí s biologickou aktivitou.

Některé takové domény nebo motivy se mohou identifikovat sekvenční analýzou, například za použití způsobů využívajících počítače.

Zjistilo se, že sekvence podle vynálezu obsahují například KK motivy.

V literatuře (Kermode, *Critical Reviews in Plant Science* 15 (4), str. 285 až 423, 1996) jsou popsány KK motivy, podvojný lysin, který byl hlavně nalezen jako KKXX nebo K X K XX motiv a který ovlivňuje recyklování z ER na aparatuře Golgi a tak dobu prodlevy proteinu a jeho enzymové aktivity v určitých lokacích, zvláště ER.

Podvojně lysinové motivy byly rovněž zjištěny například v 12-desaturázách (Arondel a kol., *Science* 258, str. 1353, 1992) a jsou také obsaženy v elongázách podle vynálezu. Byly popsány zvláště motivy, které se mohou lokalizovat na C-zakončení. V sekvencích podle vynálezu je výrazná akumulace lyzinů na C-zakončeních.

18.07.02

Mechová elongáza PSE1: C-zakončení	KQKGAKTE
SEQ ID NO:2:	KTKKA
SEQ ID NO:4:	KKSTPAAKKTN
SEQ ID NO:6:	KHLK

Jsou možné genové variace.

Existují Lys radikály, které ovlivňují cílení, adresování a lokalizaci na nebo v ER. Maskování této sekvence, modifikace nebo prostorová modifikace v sousedství konce nebo C-zakončení například fúzí se GFP "zeleným fluorescenčním proteinem" se může využít k ovlivnění kompartmentalizace.

PSE se s výhodou produkují rekombinantními DNA způsoby. Například se molekula nukleové kyseliny, kódující protein, klónuje do expresního vektoru (jak shora popsáno), expresní vektor se zavádí do hostitelské buňky (jak shora popsáno) a PSE se expresuje v hostitelské buňce. PSE se pak může izolovat z buněk vhodným způsobem čištění za použití o sobě známých způsobů čištění proteinu. Nebo se pro rekombinantní expresi PSE, PSE polypeptid nebo PSE peptid může syntetizovat chemicky o sobě známými způsoby peptidové syntézy. Nativní PSE se může izolovat z buněk (například z endotelových buněk) například za použití anti-PSe protilátky shromáždit o sobě známými způsoby za použití PSE podle vynálezu nebo jeho fragmentu.

Vynález se také týká chimérních PSE proteinů nebo PSE fúzních proteinů. Zde používaný výraz "chiméřní PSE protein" nebo "PSE fúzní protein" zahrnuje PSE polypeptid, který je funkčně vázán na ne-PSE polypeptid. "PSE polypeptidem" se míní polypeptid s aminokyselinovou sekvencí, která odpovídá PSE, zatímco "ne-PSE polypeptidem" se míní polypeptid s aminokyselinovou sekvencí, která odpovídá proteinu, který je v podstatě nehomologový se PSE, například proteinu, který se liší od PSE a který pochází z téhož nebo z jiného organismu. V souvislosti

s fúzním proteinem se výrazem "funkčně vázaný" míní, že PSE polypeptid a ne-PSE polypeptid navzájem fúzují tak, že obě sekvence splňují předem stanovenou funkci, která není připisována použité sekvenci. Ne-PSE polypeptid může fúzovat na N-zakončení nebo na C-zakončení PSE polypeptidu. Podle jednoho provedení vynálezu je fúzním proteinem například GST-PSE fúzní protein, ve kterém je PSE sekvence fúzována na C-zakončení GST sekvence. Fúzní proteiny mohou usnadňovat čištění rekombinantních PSE. Podle dalšího provedení vynálezu je fúzním proteinem PSE, která má heterologovou signální sekvenci na svém N-zakončení. V určitých hostitelských buňkách (například v savčích hostitelských buňkách) se může exprese a/nebo sekrece PSE zvyšovat použitím heterologové signální sekvence.

Chimérní PSE protein nebo PSE fúzní protein podle vynálezu se produkuje o sobě známými rekombinantními DNA technikami. Například DNA fragmenty, které kódují různé polypeptidové sekvence, se ligují navzájem ve správném čtecím rámci za použití běžných technik, například za použití zarovnaného konce nebo kohézního konce pro ligaci, restrikci enzymového štěpení pro vytvoření stabilních konců, naplnění kohézních konců jak požaduje ošetřování alkalickou fosfatázou k předcházení nežádoucích vazeb a enzymatické ligace. Podle dalšího provedení vynálezu se může fúzní gen syntetizovat o sobě známými zúsoby včetně použití DNA syntetizérů. Nebo se může provádět PCR zesílení genových fragmentů za použití kotvicích primerů, které generují komplementární převisy mezi postupnými genovými fragmenty, které se následně mohou hybridizovat a zesilovat za zvýšení chimerní genové sekvence (například Current Protocols in Molecular Biology, vyd. Ausubel a kol., John Wiley & Sons, 1992). Velký počet expresních vektorů, které již kódují fúzní jednotku (například GST polypeptid), je obchodně dostupný. PSE kódující nukleová kyselina se může klónovat do takových expresních vektorů, takže se fúzní jednotka váže ve správném čtecím rámci na PSE protein.

PSE homology se mohou generovat mutagenezí například specifickým bodem mutace nebo odříznutím PSE. Zde používaný výraz "Homology" se týká odlišné formy PSE, která působí jako agonist nebo jako antagonist PSE aktivity. PSE agonist si může v podstatě uchovávat stejnou aktivitu, jako má PSE nebo něco z jejích biologických aktivit. PSE antagonist může inhibovat jednu nebo několik aktivit přírodně se vyskytující PSE formy, například konkurenční vázání na element proti směru nebo po směru metabolické kaskády pro složky buněčné membrány, které zahrnují PSE nebo vázání na PSE, která zprostředkovává transport sloučenin buněčnými membránami a tak brání translokaci.

Podle jiného provedení vynálezu PSE homology se mohou identifikovat skríníngem kombinatorní knihovny mutantů, například seříznutých mutantů, PSE se zřetelem na PSE agonistovou nebo PSE antagonistovou aktivitu. Podle jednoho provedení vynálezu zpestřená knihovna PSE variant se generuje na úrovni nukleové kyseliny kombinatorní mutagenezí a kóduje se zpestřenou genetickou knihovnou. Zpestřená genetická knihovna PSE variant se může generovat například enzymativkou ligací směsi syntetických oligonukleotidů do genových sekvencí takže degenerátový soubor potenciálních PSE sekvencí se může expresovat jakožto individuální polypeptidy nebo jako soubor větších fúzních proteinů (například pro fágový displej), který obsahuje tento soubor PSE sekvencí. Existují četné způsoby, kterých je možno použít pro generaci knihoven potenciálních PSE homologů z degenerované oligonukleotidové sekvence. Chemická syntéza degenerované genové sekvence se může provádět za použití syntetizéru DNA a syntetický gen se tak může ligovat do vhodného expresního vektoru. Použití degenerovaného souboru genů umožňuje, aby byly všechny sekvence, které kóduje žádaný soubor potenciálních PSE sekvencí ve formě směsi. Způsoby syntézy degenerovaných oligonukleotidů jsou v oboru známy (například Narang S.A., Tetrahedron 39(3), 1983; Itakura a kol., Annu. Rev. Biochem. 53, str. 323, 1984); Itakura a kol., Science 198, str.

1056, 1984; Ike a kol., Nucleic Acids Res. 11, str. 477, 1983).

Knihoven PSE fragmentů se může použít pro zpestřenou populaci PSE fragmentů pro skrining a pro následnou selekci homologů PSE. Podle jednoho provedení vynálezu knihovna fragmentů kódujících sekvence se může generovat zpracováním dvoušroubovicového PCR fragmentu kódujícího PSE sekvenci nukleázou za podmínek, při kterých dochází pouze přibližně k jednomu lomu dvouřetězce na molekulu, k denaturaci dvouřetězcové DNA, k re-naturaci DNA vytvořením dvouřetězcové DNA, která zahrnuje páry se smyslem a antismyslem různých produktů s dvouřetězcovým lmem, odstranění jednořetězcových sekcí z nově vytvořených duplicit zpracováním S1 nukleázou a ligací rezultující fragmentové knihovny do expresního vektoru. Tento způsob umožňuje odvozovat expresní knihovnu, která kóduje N-koncové, C-koncové a interní fragmenty různě velkých PSE.

Byly vyvinuty četné způsoby pro skrínování genových produktů v kombinatorních knihovnách, které se generovaly bodovou mutací nebo transdukcí a pro skrining cDNA knihoven pro genové produkty se selektovanými vlastnostmi. Tyto způsoby se mohou přizpůsobit pro rychlý skrining genetických knihoven, které se generovaly kombinatorní mutagenezí PSE homologů. Nejčastější způsob skrínování velkých genetických knihoven, které se mohou podrobovat vysoce výkonné analýze zpravidla zahrnuje klónování genetických knihoven do replikovatelných expresních vektorů, transformování vhodných buněk rezultující vektorovou knihovnou, a expresi kombinatorních genů za podmínek, při které detekci žádané aktivity usnadňuje izolaci vektoru kódujícího gen, jehož produkt se má stanovovat. Rekurzivní souborová mutagenéze (REM), nový způsob zvyšování frekvence funkčních mutantů v knihovnách, se může použít v kombinaci se skrínovacími zkouškami pro identifikaci PSE homologů (Arkin a Yourvan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, str. 7811 až 7815, 1992; Delgrave a kol., Protein Engineering 6(3), str. 327 až 331,

1993). Kombinace shora uvedených způsobů se s výhodou také může používat.

Další známý způsob modifikace katalytických vlastností enzymů nebo genů je kódujících je genové přeskupení ("gen shuffling") (například světový patentový spis číslo WO 97/20078 nebo WO 98/13487), které je kombinací genových fragmentů, přičemž tyto nové kombinace mohou být přidavně obměňovány chybnými polymerázovými řetězovými reakcemi za vytvoření vysoké sekvenční rozmanitosti, která se zkouší. Avšak předpokladem pro použití takového přístupu je vhodný skrínovací systém pro testování získané genové rozmanitosti se zřetelem na funkcionalitu.

Skrínovací způsob, který identifikuje na PUFA závislou enzymovou aktivitu nebo aktivity je předpokladem zvláště pro skrínung elongázových aktivit. Se zřetelem na elongázové aktivity se specificitou pro PUFA se může využít toxicita arašidonové kyseliny v přítomnosti toxického metabolitu (v tomto případě salicylové kyseliny nebo derivátů salicylové kyseliny) ve species *Mucor*, která se může transformovat žádanými genovými konstrukty o sobě známými transformačními způsoby (Eroshin a kol., *Mikrobiologia*, svazek 65, číslo 1, str. 31 až 36, 1996) pro provádění na růstu založeného primárního skrínungu. Rezultující klony se mohou analyzovat na své lipidové složky způsobem plynové chromatografie a hmotové spektroskopie za účelem identifikace povahy a kvality výchozích látek a produktů.

Podle dalšího provedení vynálezu zkoušky založené na buňkách se mohou využít pro analýzu zpestřené PSE knihovny za použití dalších způsobů v oboru o sobě známých.

Vynález se dále týká protilátky, která se specificky váže na polypeptid podle vynálezu nebo na jeho část, například

epitopy takového proteinu. Protilátka podle vynálezu se může využívat k identifikaci a k izolaci jiných elongáz, zvláště PSE. Tyto protilátky mohou být monoklonálními protilátkami, polyklonálními protilátkami nebo syntetickými protilátkami a také fragmenty těchto protilátek, jako jsou například Fab, Fv nebo scFV fragmenty. Monoklonální protilátky se mohou připravovat například způsoby, které popsal Köhler a Milstein (Nature 256, str. 485, 1975) a Galfrö (Meth. Enzymol. 73, 1981). Protilátky a jejich fragmenty se mohou také připravovat například způsobem, který popsal Harlow & Lane ("Antibodies, a Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988). Tyto protilátky se mohou používat ke srážení a k lokalizaci, například proteiny podle vynálezu, nebo k monitorování syntézy těchto proteinů, například rekombinantní organizmy, a k identifikaci sloučenin, které navzájem působí s proteiny podle vynálezu. V mnoha případech je vázání protilátek na antigeny ekvivalentní vázání na jiné ligandy a antiligandy.

Vynález se dále týká způsobu pro identifikaci agonistu nebo antagonistu elongáz, zvláště PSE, při které

- a) uvádějí se do styku buňky, které expresují polypeptid podle vynálezu, s kandidátskou substancí,
- b) testuje se PSE aktivita,
- c) porovnává se PSE aktivita se standardní aktivitou v nepřítomnosti kandidátské substance, přičemž PSE aktivita, která je vyšší než standard, naznačuje, že kandidátská substance je agonistem a přičemž PSE aktivita, která je nižší než standard, naznačuje, že kandidátská substance je antagonistem.

Kandidátskou substancí se míní substance, která se chemicky syntetizuje nebo se produkuje mikrobiologicky a je obsa-

žena například v buněčných extraktech například rostlin, živočichů nebo mikroorganismů. Taková substance může být ze stavu techniky známá, avšak dosud o ní nebylo známo, že zvyšuje nebo potlačuje aktivitu PSE. Reakční směsi mohou být buněk prosté extrakty nebo mohou obsahovat buňku nebo buněčnou kulturu. Vhodné způsoby jsou pracovníkům v oboru známy a obecně jsou popsány (například Alberts, *Molecular Biology of the cell*, 3. vydání 1994, například kapitola 17). Substance se mohou přidávat například do reakční směsi nebo do kultivačního prostředí nebo se mohou injektovat do buněk nebo nastříkávat na rostlinu.

Pokud vzorek, který obsahuje substanci aktivní při způsobu podle vynálezu, se identifikuje, je možné buď substanci přímo z originálního vzorku izolovat nebo rozdělit vzorek na různé skupiny, například pokud sestává z velkého počtu různých složek, ke snížení počtu různých substancí ve vzorku a potom opakovat způsob podle vynálezu s takovým "podvzorkem" původního vzorku. V závislosti na komplexitě vzorku se popsané stupně mohou opakovat několikrát, s výhodou pokud se vzorek identifikuje způsobem podle vynálezu a obsahuje pouze malý počet substancí nebo pouze jedinou substanci. Substance, identifikovaná způsobem podle vynálezu nebo její derivát, se s výhodou formuluje dále, aby byla vhodná pro použití při pěstování rostlin nebo rostlinných buněk nebo tkáňové kultury.

Jakožto substance, které se mohou identifikovat a testovat způsobem podle vynálezu, se uvádějí například: expresní knihovny například cDNA expresní knihovny, peptidy, proteiny nukleové kyseliny, protilátky, malé organické substance, hormony, PNA (Milner, *Nature Medicin* 1, str. 879 až 880, 1995; Hupp, *Cell*. 83, str. 237 až 245, 1995; Gibbs, *Cell*. 79, str. 193 až 198, 1994; a připojená literatura). Tyto substance mohou být také funkčními deriváty nebo analogy známých inhibitorů nebo aktivátorů. Způsoby pro přípravu chemických derivátů

nebo analogů jsou pracovníkům v oboru známy. Známé deriváty a analogy se mohou testovat způsoby známými ze stavu techniky. Je dále možné používat konstrukce za použití počítače nebo peptidomimetik pro přípravu vhodných derivátů a analogů. Používané buňky nebo tkáně pro zůsob nebo pro způsoby podle vynálezu jsou s výhodou hostitelské buňky, rostlinné buňky nebo rostlinné tkáně podle vynálezu shora popsané.

Vynález se také týká substance, která se identifikuje způsobem podle vynálezu pro účely vynálezu. Substancí je například homolog PSE podle vynálezu. Homology PSE se mohou generovat mutagenézí například bodovou mutagenézí, například bodovou mutací nebo delecí PSE. Výrazem "homolog" se v tomto případě míní variantová forma PSE, která působí jako agonist nebo jako antagonist na PSE aktivitu. Agonist může mít v postatě stejnou nebo částečnou biologickou aktivitu jako PSE. Antagonist PSE může inhibovat jednu nebo několik aktivit přírodně se vyskytujících forem PSE, například vázat konkurenčně členu ve směru nebo proti směru metabolické cesty syntézy mastné kyseliny včetně PSE, nebo vázat se na PSE a snižovat nebo inhibovat aktivitu při procesu.

Vynález se také týká protilátky nebo jejího fragmentu, zde popsánoho, který inhibuje aktivitu PSE podle vynálezu.

Vynález se také týká protilátky, která specificky rozpoznává nebo se váže na shora uvedený agonist nebo antagonist podle vynálezu.

Vynález se také týká kompozice, která obsahuje protilátku, stop nebo antismyslovou molekulu identifikovanou způsobem podle vynálezu.

E. Použití procesů/způsobů podle vynálezu

Molekuly nukleové kyseliny, proteiny, proteinové homology, fúzní proteiny, protilátky, primery, vektory a hostitelské buňky zde popsané se mohou používat v jednom nebo v několika dále uvedených způsobů: identifikace organismu *Physcomitrella patens*, *Crypthecodinium*, *Phytophthora infestans* nebo *Thraustochytrium* a příbuzných organismů, genomové napování organismů, které se týká organismů *Physcomitrella patens*, *Crypthecodinium*, *Phytophthora infestans* nebo *Thraustochytrium*, identifikace a lokalizace sekvencí organismů *Physcomitrella patens*, *Crypthecodinium*, *Phytophthora infestans* nebo *Thraustochytrium*, které jsou předmětem zájmu, evoluční studie, stanovení PSE proteinových regionů potřebným pro funkci, modulace PSE aktivity, modulace metabolismu jedné nebo několika složek buněčné membrány, modulace transmembránového transportu jedné nebo několika sloučenin a modulace buněčné produkce žádané sloučeniny, například jemné chemikálie. PSE molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu mají četná použití. Především se mohou použít pro identifikaci organismu jako jsou *Physcomitrella*, *Crypthecodinium*, *Phytophthora* nebo *Thraustochytrium* a těsně příbuzných organismů. Mohou se také použít pro identifikaci přítomnosti organismů *Physcomitrella*, *Crypthecodinium*, *Phytophthora* nebo *Thraustochytrium* nebo příbuzných organismů ve smíšené populaci mikroorganismů. Vynález se týká sekvencí nukleové kyseliny genů *Physcomitrella*, *Crypthecodinium*, *Phytophthora* nebo *Thraustochytrium*; přítomnost nebo nepřítomnost těchto organismů se může stanovit skrínováním extrahované genomové DNA kultury uniformní nebo smíšené populace mikroorganismů za přísných podmínek se sondou pokrývající region genu *Physcomitrella*, *Crypthecodinium*, *Phytophthora* nebo *Thraustochytrium*, který je jedinečný pro tento organismus nebo část tohoto genu. Organismy *Physcomitrella*, *Crypthecodinium*, *Phytophthora* nebo *Thraustochytrium* se používají pro provozní výrobu polynenasycených kyselin. Nukleové kyseliny podle vynálezu

jsou vhodné pro výrobu PUFA také v jiných organizmech, zvláště pokud je záměrem rezultující PUFA začlenit do triacylglycerolové frakce.

Molekuly nukleové kyseliny a proteinu podle vynálezu mohou působit jako signální znaky pro specifické regiony genomu. Jsou vhodné nejen pro mapování genomu avšak také pro funkční studie proteinů organismů *Physcomitrella*, *Crypthecodinium*, *Phytophthora* nebo *Thraustochytrium*. Pro identifikaci genomového regionu, do kterého určitý DNA vázající protein genomu organismů *Physcomitrella*, *Crypthecodinium*, *Phytophthora* nebo *Thraustochytrium* se může například fragmentovat a fragmenty se mohou inkubovat s DNA vázajícím proteinem. Fragmenty, vázající protein, se mohou přídatně skrínovat s molekulami nukleové kyseliny podle vynálezu, s výhodou se snadno zjistitelnými signální znaky; vázání takové molekuly nukleové kyseliny na genomový fragment umožňuje lokalizaci fragmentu na genomové mapě organismů *Physcomitrella*, *Crypthecodinium*, *Phytophthora* nebo *Thraustochytrium* a pokud se to provádí opakovaně s různými enzymy, usnadňuje rychlé stanovení sekvence nukleové kyseliny, na kterou se protein váže. Molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu mají dostatečnou homologii se sekvencemi příbuzných species pro tyto molekuly nukleové kyseliny, takže mohou působit jako signální znaky pro konstrukci genomové mapy hub a řas.

Molekuly PSE nukleové kyseliny podle vynálezu jsou také vhodné pro evoluční studie proteinové struktury. Metabolické a transpirtní procesy, ve kterých jsou molekuly podle vynálezu zahrnutým se využívají pro velké množství prokaryotických a eukaryotických buněk; evoluční stupeň vztahu organismů se může stanovit porovnáním sekvencí molekul nukleové kyseliny podle vynálezu s molekulami, které kódují podobné enzymy z jiných organismů. Takové porovnání umožňuje stanovit, které ze sekvencí regionů jsou konzervovány a které nejsou konzervovány,

což může pomáhat, při stanovování regionů proteinu, který jsou podstatné pro enzymovou funkci. Tento typ stanovení je užitečný pro proteinové inženýrské studie a může poskytovat klíč, jak velká mutageneze proteinu je přijatelná bez ztráty jeho funkce.

Manipulace molekul nukleové kyseliny podle vynálezu může vést k produkci PSE s funkčními odlišnostmi od divokého typu PSE. Účinnost nebo aktivita těchto proteinů se může zlepšit; mohou být obsaženy v buňce ve větším množství, než je obvyklé; nebo se jejich účinnost a aktivita může zmenšit. Zlepšení účinnosti nebo aktivity znamená například, že enzym má vyšší selektivitu a/nebo aktivitu, s výhodou aktivitu, která je alespoň o 10 % vyšší, s výhodou alespoň o 20 % vyšší, a ještě výhodněji alespoň o 30 % vyšší, než je aktivita původního enzymu.

Je řada mechanismů, kterými modifikace PSE podle vynálezu, obsahující takový modifikovaný protein, může přímo ovlivňovat výtěžek, produkci a/nebo produkční účinnosti jemných chemikálií. Získání jemných chemikálií z kultur ciliates, řas nebo hub v provozním měřítku se výrazně zlepší, když buňky sekretují žádané sloučeniny, jelikož se tyto sloučeniny snadněji izolují z kultivačního prostředí (na rozdíl od extrakce z biomas kultivovaným buněk). Čištění se tedy může zlepšit, jestliže buňky ukládají sloučeniny in vivo ve specializovaných prostorách s typem koncentračního mechanismu. V rostlinách, které expresují PSE, může vést zvýšený transport k lepšímu rozdělení v rostlinné tkáni a v rostlinných orgánech. Zvýšení počtu nebo aktivity transportujících molekul, které exportují jemné chemikálie z buňky, může umožnit zvýšení množství produkované jemné chemikálie, která je obsažena v extracelulárním prostředí, čímž se usnadňuje sklizení a čištění, nebo v případě rostlin účinnější distribuce. Na rozdíl od toho jsou žádoucí zvýšená množství kofaktorů, prekursorových molekul a mezi-

produktů pro vhodné biosyntézní cesty pro účinnou nadprodukcii jedné nebo několika jemných chemikálií. Zvýšení počtu a/nebo aktivity transportních proteinů, zahrnutých v dodávání živin, jako jsou zdroje uhlíku (to je cukrů), zdroje dusíku (to jsou aminokyseliny, amoniové soli), fosfátu a síry, může zlepšit produkci jemných chemikálií v důsledku eliminace všech omezení živin dostupných v biosyntézních procesech. Mastné kyseliny jako PUFA a lipidy, obsahující PUFA, jsou samotné žádoucí jemné chemikálie. Optimalizace aktivity nebo zvýšení počtu jedné nebo několika PSE podle vynálezu, zahrnutých v biosyntéze těchto sloučenin, nebo narušení aktivity jedné nebo několika PSE podle vynálezu, zahrnutých v odbourání těchto sloučenin, může tak zvyšovat výtěžek, produkci a/nebo produkční účinnost molekul mastných kyselin a lipidů v organizmech, jako jsou ciliates, řasy, rostliny, houby, kvasinky nebo mikroorganismy.

Manipulace jednoho nebo několika PSE genů podle vynálezu může vést podobně k PSE s modifikovanými aktivitami, které nepřímo ovlivňují produkci jedné nebo několika žádaných jemných chemikálií z organismů, jako jsou řasy, rostliny, ciliates nebo houby. Normální biochemické metabolické procesy vedou například k produkci četných odpadních produktů (například peroxid vodíku a jiné reaktivní kyslíkaté sloučeniny), které mohou aktivně narušit tyto metabolické procesy (například peroxynitrit, jak známo, nitrátuje tyrosinové postranní řetězce, tak inaktivuje některé enzymy s tyrosinem v aktivním centru; Groves J.T., Curr. Opin, Chem. Biol. 3(2), str. 226 až 235, 1999). Jakkoliv se tyto odpadní produkty normálně exkretují, používané buňky pro fermentační produkci v provozním měřítku se optimalizují pro nadprodukcii jedné nebo několika jemných chemikálií a může se tak produkovat více odpadních produktů, než je běžné v případě buněk divokého typu. Optimalizace aktivity jedné nebo několika PSE podle vynálezu, která se podílí na exportu odpadních molekul, umožňuje zlepšení životnosti buňky a udržení její účinné metabolické aktivity. Také obsah

vysokého intracelulárního množství žádané jemné chemikálie může být ve skutečnosti pro buňku toxický, takže se životnost buňky může zlepšit zvýšením schopnosti buňky sekretovat takové sloučeniny.

PSE podle vynálezu se může manipulovat takovým způsobem, že se modifikují relativní množství různých molekul lipidu a mastné kyseliny. To může mít rozhodující vliv na složení lipidu bunčné membrány. Jelikož takový typ lipidu má různé fyzikální vlastnosti, modifikace lipidového složení membrány může výrazně modifikovat membránovou fluiditu. Změny membránové fluidity mohou ovlivňovat transport molekul membránou, jak shora vysvětleno, mohou ovlivňovat export odpadních produktů nebo produkovaných jemných chemikálií nebo import potřebných živin. Tyto změny fluidity membrány mohou také mít rozhodující vliv na integritu buňky; buňky se srovnatelně slabšími membránami jsou citlivější na abiotické a biotické stresové podmínky, které mohou poškozovat nebo usmrcovat buňku. Manipulace PSE, které se podílejí na produkci mastných kyselin a lipidů pro syntézu membrán, takže produkované membrány mají membránové složení, které je citlivější na okolní podmínky, převažující v kulturách používaných pro produkci jemných chemikálií, má umožňovat většímu počtu buněk přežít a množit se. Velká množství produkujících buněk se sama o sobě projevují vyššími výtěžky, vyšší produkcí a vyšší produkční účinností jemných chemikálií z kultury.

Shora zmíněné mutagenézní strategie pro PSE záměrné pro zvýšení výtěžku jemných chemikálií nejsou konstruovány jako omezení; variace těchto strategií jsou pracovníkům v oboru známy. Za využití těchto mechanismů a za použití zde popisovaných mechanismů molekuly nukleové kyseliny a proteinu podle vynálezu se mohou používat pro generaci řas, ciliates, rostlin, živočichů, hub a jiných mikroorganismů, jako je *C. glutamicum*, které expresují mutované PSE molekuly nukleové kyseliny

a proteinu, takže se výtěžek, produkce a/nebo produkční účinnost žádaných sloučenin zlepšuje. Touto žádanou sloučeninou může být jakýkoliv přírodní produkt z organismů, jako jsou řasy, ciliates, rostliny, živočichové, houby nebo bakterie, které zahrnují konečné produkty biosyntézní cesty a meziprodukty přírodně probíhající metabolické cesty, a také molekuly, které se přirozeně nevyskytují v metabolismu těchto buněk, avšak jsou produkovány buňkami podle vynálezu.

Dalším provedením vynálezu je způsob produkce PUFA, při kterém se kultivuje organismus obsahující nukleovou kyselinu podle vynálezu, genový konstrukt podle vynálezu nebo vektor podle vynálezu, který kóduje polypeptid, který elonguje mastné kyseliny se 16, s 18 nebo se 20 atomy uhlíku, obsahující alespoň dvě dvojně vazby ve skeletu molekuly mastné kyseliny o alespoň dva atomy uhlíku za podmínek, při kterých se PUFA produkují v organismu. PUFA, produkovávané tímto způsobem, se izolují sklízením organismů buď z kultivačního prostředí, ve kterém rostly nebo z pole a rozrušením a/nebo extrakcí sklizeného materiálu organickým rozpouštědlem. Olej, který obsahuje lipidy, fosfolipidy, sphingolipidy, glykolipidy, triacylglyceroly a/nebo volné mastné kyseliny s vyšším obsahem PUFA, se může izolovat z takového rozpouštědla. Volné mastné kyseliny s vyšším obsahem PUFA se mohou izolovat zásaditou nebo kyselou hydrolýzou lipidů, fosfolipidů, sphingolipidů, glykolipidů, triacylglycerolů. Vyšším obsahem PUFA se míní obsah alespoň o 5%, s výhodou alespoň o 10 %, ještě výhodněji alespoň o 20 % a zvláště výhodně alespoň o 40 % než v případě původních organismů, které neobsahují zakódovanou přídatnou nukleovou kyselinu kódující elongázovou aktivitu podle vynálezu.

PUFA, produkovávané tímto způsobem, jsou s výhodou molekuly mastné kyseliny mající 18, 20 nebo 22 atomů uhlíku a alespoň dvě dvojně vazby v molekule mastné kyseliny, s výhodou tři, čtyři pět nebo šest dvojných vazeb, především tři nebo pět

dvojných vazeb. Tyto molekuly mastné kyseliny se 16, s 20 nebo se 22 atomy uhlíku se mohou izolovat z organismů ve formě oleje, lipidu nebo volné mastné kyseliny. Příklady vhodných organizmů jsou shora uvedeny. Výhodnými organizmy jsou mikroorganizmy, živočichové nebo rostliny, zvláště s výhodou rostliny nebo řasy, především transgenické rostliny.

Jedním provedením vynálezu jsou oleje, lipidy, mastné kyseliny nebo jejich frakce, které se získaly shora uvedeným způsobem, zvláště s výhodou kompozice oleje, lipidu nebo mastné kyseliny obsahující PUFA a pocházející z transgenických rostlin.

Jedním provedením vynálezu jsou oleje, lipidy, mastné kyseliny nebo jejich frakce, které se získaly způsobem podle vynálezu. Jiným provedením vynálezu jsou kompozice oleje, lipidu nebo mastné kyseliny obsahující PUFA, produkované způsobem podle vynálezu a odvozené z transgenických rostlin, které obsahují nukleovou kyselinu, genový konstrukt nebo vektor podle vynálezu.

Dalším provedením vynálezu je použití kompozic oleje, lipidu, mastné kyseliny v krmivech, v potravinách, v kosmetických nebo ve farmaceutických prostředcích.

Dalším provedením vynálezu je kit obsahující nukleovou kyselinu podle vynálezu, genový konstrukt podle vynálezu, aminokyselinovou sekvenci podle vynálezu, antismyslovou molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu, antilátku a/nebo kompozici podle vynálezu, antagonist nebo agonist připravený způsobem podle vynálezu a/nebo oleje, lipidy a/nebo mastné kyseliny podle vynálezu nebo jejich frakce. Kit může také obsahovat hostitelské buňky, organizmy nebo rostliny podle vynálezu nebo jejich části, části rostlin podle vynálezu, které se mohou sklízet nebo propagační materiál nebo jiný antagonist nebo

agonist podle vynálezu. Složky kitu podle vynálezu se mohou ukládat do vhodných obalů například spolu s pufrem nebo v puf-ru nebo v jiných rozpouštědlech. Jedna nebo několik shora zmí-
něných složek se může balit do jednoho a téhož obalu. Přídavně
nebo alternativně jedna nebo několik zmíněných složek se na-
příklad může absorbovat na pevném povrchu, například na nitro-
celulózovém filtru, na skleněné destičce, na štěpinách, na ny-
lonových membránách nebo na mikrotitračních destičkách. Kitu
se může používat pro kterýkoliv shora popsaný způsob a shora
popsané provedení, například pro produkci hostitelkých buněk,
transgenických rostlin, pro detekci homologových sekvencí, pro
identifikaci antagonistů a agonistů. Kit může obsahovat inst-
rukce ke svému použití v případě shora uvedených účelů.

Následující příklady praktického provedení vynález pod-
robně objasňují, nijak však neomezují. Vynález objasňují také
připojené obrázky.

Seznam obrázků na výkresech

Obr. 1 Seřazení kvasinkového elolpeptidu (horní řádek)
s *Physcomitrella patens* PpPSE1

Obr. 2a až 2e GC analýza FAME

Obr. 3a DMOX derivát cis 6,9,12 18:3

Obr. 3b Hmotové spektrum DMOX derivátu cis 6,9,12 18:3

Obr. 4a DMOX derivát cis 8,11,14 20:3

Obr. 4b Hmotové spektrum DMOX derivátu cis 8,11,14 20:3

Obr. 5 Výsledek porovnání peptidové sekvence Pp_PSE1

s nalezenou sekvencí

- Obr. 6 Seřazení peptidové sekvence Pp_PSE1 s nalezenou sekvencí
- Obr. 7 souboru sekvencí virtuálně úplného elongázového polypeptidu
- Obr. 8 Seřazení polypeptidové sekvence PpPSE1 a Tc_PSE2
- Obr. 9 Porovnání polypeptidové sekvence CC_PSE1 s Tc_PSE2
- Obr. 10 Sekvenční motivy

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Obecné způsoby

a) Obecný způsob klonování

Provádějí se způsoby klonování, jako například restriční štěpení, elektroforéza agarového gelu, čištění fragmentů DNA, převod nukleových kyselin na nitrocelulóзовé a nylonové membrány, vazba fragmentů DNA, transformace *Escherichia coli* a kvasnicových buněk, pěstování bakterií a sekvenční analýza rekombinantních DNA, podle návodů popsaných v literatuře (Sambrook a kol., Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6, 1989; Kaiser, Michaelis a Mitchell "Methods of Yeast Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-451-3, 1994). Transformace a pěstování řas, jako je *Chlorella* nebo *Phaeodactylum* se provádějí rovněž způsobem popsaným v literatuře (El-Shekh: *Biologia Plantarum* 42, str. 209 až 216, 1999; Apt a kol., *Molecular and General Genetics* 252 (5), str.

872 až 879, 1996.

b) Chemikálie

Pokud není v textu uvedeno jinak, používá se chemikálií dostupných v analytické kvalitě od firem Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) a Sigma (Deisenhofen). Roztoky se připravují za použití čisté vody prosté pyrogenů, označované v dalším textu jako voda (H₂O) (obchodní produkt Milli-Q water system water purification unit společnosti Millipore, Eschborn). Restrikční endonukleázy, DNA-modifikující enzymy a kity "molecular biology kits" jsou obchodní produkty společnosti AGS (Heidelberg), Amersham (Brunswick), Biometra (Göttingen), Boehringer (Mannheim), Genomed (Bad Oeynhausen), New England Biolabs (Schwalbach/Tausnus), Novagen (Madison, Wisconsin, Sp. st. a.), Perkin-Elmer (Weiterstadt), Pharmacia (Freiburg), Qiagen (Hilden) a Tratagene (Amsterdam, Nizozemsko). Pokud není uvedeno jinak, používá se chemikálií podle instrukcí výrobce.

c) Buněčný materiál

Uvedené studie se provádějí za použití kmene Thraustochytrium, který je uchováván organizací American Type Culture Collection (ATCC) s číslem kmene ATCC26185 (Thraustochytrium), nebo v případě Crypthecodinium organizací Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton ((CCMP) West Boothbay Harbour, ME, Sp. St. A.) pod číslem CCMP316. Řasy se pěstují ve tmě při teplotě 25 °C ve skleněných trubicích, do kterých se vzduch vhání zespodu. Alternativně se pěstují Thraustochytrium podle návodu, který podrobně popsali Singh & Ward (Advances in Microbiology 45, str. 271 až 311, 1997).

Kultivačním prostředím pro Crypthecodinium je f/2 culture

medium doplněné 10% organickým prostředím společnosti Guillard, R.R.L. (Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates, Smith W.L. a Chanley M.H. (vydavatelé) Culture of marine Invertebrate animals, NY Plenum Press, str.29 až 60, 1975).
Obsahuje

995,5 ml (umělé) slané vody;

1 ml dusičnanu sodného (75 g/l), 1 ml natriumdihydrogenfosforečnanu (5 g/l), 1 ml roztoku stopového kovu, 1 ml Tris/HCl o hodnotě pH 8,0, 0,5 ml f/2 vitaminového roztoku;

roztok stopového kovu: Na_2EDTA (4,36 g/l), chlorid železitý (3,15 g/l);

primární stopové kovy: síran měďnatý (10 g/l), síran zinečnatý (22 g/l), chlorid kobaltnatý (10 g/l), chlorid manganatý (18 g/l), molybdenan sodný (6,3 g/l);

f/2 vitaminový roztok: biotin 10 mg/l, thiamin 200 mg/l, vitamin B12 0,1 mg/l;

organické prostředí: octan sodný (1g/l), glukóza (6 g/l), sukcinát sodný (3 g/l), Bacto-trypton (4 g/l), kvasnicový extrakt (2 g/l).

d) Mechový material (= rostlinný material):

Pro tuto studii bylo použito rostlin druhu *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. ze sbírky oddělení genetických studií university v Hamburgu. Jsou odvozeny od kmene 16/14, který sklídl H.L.K. Whitehouse (Gransden Wood, Huntingdonshire, Anglie) a vypěstoval Engel (Am. J. Bot. 55, str. 438 až 446, 1968) ze spór. Proliferace rostlin se provedla pomocí spór a regenerací gametophyt. Protonema, vyvinutá z haploidních spór do chloroplastem bohaté chloronemy a o chloroplast ochuzená caulonema, vyklíčila po přibližně 12 dnech. Tyto klíčky vyrostly do gametophor s antheridia a archegonia. Oplodněním se získal diploidním sporophyt s krátkou štětinou a spórovou tobolkou, ve které dozrály meiospóry.

e) Kultivace rostlin

Rostliny se pěstují v inkubátoru s řízeným prostředím při teplotě vzduchu 25 °C a s intenzitou světla 55 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ (bílé světlo: fluorescenční lampa Philips TL 65W/25) a s režimem světlo/tma 16/8 hodin. Mech se pěstuje jednak v mokré kultuře za použití modifikovaného pupenového prostředí, které popsal Reski a Abel (Planta 165, str. 354 až 358, 1985) jednak na pevném pupenovém prostředí s použitím 1% oxidového agaru (Unipath, Bassingstoke, Anglie).

Protonemata použitá k izolování RNA a DNA se pěstuje ve provzdušňovaných kapalných kulturách. Protonemata se rozmělnuje každých 9 dní a přenáší se do čerstvého kultivačního prostředí.

f) Kultivace *Phytophthora infestans*

Napřed se připraví knihovna cDNA *Phytophthora infestans*. K tomu je možno získat kmen ATCC 48886 ze sbírky American Type Culture Collection Rockville, Sp. st. a. Jako varianta kultivačního protokolu předepsaného pro kmen ATCC 48886, se spóry *Phytophthora* promyjí studenou, dvakrát destilovanou vodou a ponechají v ledničce šest hodin k navození sporulace. Materiál se pak přenesse do prostředí hrachu. Za tímto účelem se udržuje 150 g hluboce zmraženého hrachu (Iglu získatelné z místních supermarketů) v autoklávu za sterilních podmínek a 1 litru vody po dobu 20 minut. Materiál se pěstuje ve 100 ml-baňkách při teplotě místnosti na oběhovém šejkru (200 otáček za minutu). Po dvou dnech obsah baněk zfiltruje a zbytek na filtru se rozetře v suchém dusíku pomocí hmoždíře a paličky a po následujících čtyřech dnech se proces opakuje vždy ve dvou baňkách.

Příklad 2

Izolace celé DNA z rostlin a z mikroorganismů jako je *Thraustochytrium* a *Crypthecodinium* pro hybridizační pokusy

Podrobnosti o izolaci celkové DNA se týkají zpracování rostlinného materiálu s čerstvou hmotností 1 g.

Pufř CTAB: 2% (hm/obj) N-acetyl-N,N,N-trimethylamonmumbromid (CTAB): 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA.

N-Laurylsarkosinový pufř: 10% (hm/obj) N-laurylsarkosin, 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 20 mM EDTA.

Rostlinný materiál nebo materiál buněk *Crypthecodinium* nebo *Thraustochytrium* se trituruje v prostředí kaplného dusíku ve hmoždíři na jemný prášek a přenesse se do 2 ml Eppendorfových baněk. Zmrazený rostlinný materiál se pokryje vrstvou 1 ml rozkladového pufřu (1 ml pufřu CTAB, 100 ml N-laurylsarkosinového pufřu, 20 ml β -metkptoethanolu a 10 ml roztoku proteinázy K, 10 mg/ml) a inkubuje se jednu hodinu při teplotě 60 °C za stálého protřepávání. Získaný homogenizát se rozdělí do dvou Eppendorfových baněk (2 ml) a extrahuje se dvakrát protřepáváním se stejným objemem alkoholového roztoku chloroform/isoamylalkohol (24:1). K oddělení fází se použije odstředění při 8000 g a při teplotě místnosti (= teplota místnosti = -23 °C) vždy po dobu 15 minut. DNA se pak vysráží při teplotě -70 °C po dobu 30 minut s použitím ledového isopropanolu. Vysrážená DNA se nechá usadit při teplotě 4 °C a odstředění při 10000 g po dobu 30 minut a resuspenduje se ve 180 ml TE pufřu (Sambrook a kol., Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6, 1989). K dalšímu čištění se DNA zpracuje chloridem sodným (konečná koncentrace 1,2M) a znovu se vysráží 30 minut při teplotě -70 °C za použití dvojnásobného množství absolutního ethanolu. Po promytí 70% ethanolem se DNA usuší a pak se

vyjme do 50 ml vody + RNase (konečná koncentrace 50 mg/ml). DNA se rozpustí přes noc při teplotě 4 °C a štěpení pomocí RNase se pak provádí jednu hodinu při teplotě 37 °C. DNA se u-skladní při teplotě 4 °C.

Příklad 3

Izolace celkové RNA a poly(A)⁺-RNA z rostlin a mikroorganismů (Crypthecodinium a Thraustochytrium)

Celková RNA se izoluje z rostlinných materiálů jako je lněné semínko a řepka olejka způsobem, který popsal Logemann a kol. (Anal. Biochem. 163, str. 21, 1987). Celková RNA z mechu může být získána z protonemové tkáně způsobem GTC (Reski a kol., Mol. Gen. Genet. 244, str. 352 až 359, 1994).

Izolace RNA z Crypthecodinium a Thraustochytrium

Zmrazené vzorky řas (-70 °C) se trituruje v ledově studeném hmoždíři v prostředí tekutého dusíku na jemný prášek. Dva objemy homogenizačního prostředí (12,024 g sorbitolu, 40,0 ml Tris-HCl, pH 9 (0,2 M), 12,0 ml 5M NaCl (0,3 M), 8,0 ml 250 mM EDTA, 761,0 mg EGTA, 40,0 ml 10% SDS se vnesou do 200 ml vody a hodnota pH se upraví na 8,5) a do prášku zmrazených buněk se přidají 4 objemy fenolu s 0,2 % merkaptoethanolu při teplotě 40 až 50 °C za opatrného míchání. Přidají se dva 2 objemy chloroformu a směs se míchá intenzivně 15 minut. Směs se odstřeďuje 10 minut při 10 000 g a vodná fáze se extrahuje systémem fenol/chloroform (2 objemy/2 objemy) a pak chloroformem.

Výsledný objem vodné fáze se zpracuje 1/20 objemu 4M octanu sodného (pH 6) a 1 objemem (ledově studeného) isopropanolu a nukleové kyseliny se vysrážejí při teplotě -20 °C. Směs se odstřeďuje 30 minut při 10 000 g a supernatant se odsaje. Následuje promytí 70% ethanolem a další odstředění. Sediment

se vyjme do Tris borátového pufru (80 mM Tris borátový pufr, 10 mM EDTA, pH 7,0). Supernatant se pak zpracuje 1/3 objemem 8M chloridu lithného, míchá se a inkubuje 30 minut při teplotě 4 °C. Po opětném odstředění se sediment promyje 70% ethanolem, odstředí se a sediment se rozpustí ve vodě prosté RNázy.

Poly(A)⁺-RNA se izoluje pomocí Dyna Beads^R (Dynal, Oslo, Norsko) podle protokolu výrobce.

Po stanovení koncentrace RNA nebo poly(A)⁺-RNA se RNA vysráží přidáním 1/10 objemu 3M octanu sodného, hodnota pH 4,6 a dvou objemů ethanolu a uskladní se při teplotě -70 °C.

Pro analýzu se oddělí podíly RNA o hmotnosti 20 µg ve formaldehydu obsahujícím 1,5 % agarového gelu a přenesou se na nylonové membrány (Hybond, Amersham). Proveďte se detekce specifických transkriptů způsobem, který popsal Amasino (Anal. Biochem. 152, str. 304, 1986)

Izolace celkové RNA a poly-(A)⁺ RNA z *Phytophthora infestans*

Za použití kitu (RNeasy Plant Total RNA kit, Quiagen, Milden) se získá úplná RNA a v ní obsažený pufr podle instrukcí výrobce. Z takto získané úplné RNA se izoluje poly-(A)⁺ RNA za použití Poly Attract v systému RNA Isolation System III (společnost Promega, Heidelberg) podle instrukcí výrobce.

Příklad 4

Konstrukce knihovny cDNA

Ke zkonstruování knihovny cDNA z *Physcomitrella Cryptocodium* a *Thraustochytrium* se provede analýza prvního kmene za použití reverzní transkriptázy myšího viru leukemie (Roche, Mannheim, Německo) a primerů oligo-d(T), zatímco syntéza dru-

hého kmene se provede inkubací s DNA polymerázou I, Klenowův enzym, a štěpením s RNase H při teplotě 12 °C (dvě hodiny), 16 °C (jednu hodinu) a 22 °C (jednu hodinu). Reakce se ukončí inkubací při teplotě 65 °C (10 minut), načež se materiál přenesse na led. Připraví se dvouřetězcové DNA molekuly s tupými konci za použití T4 DNA polymerázy (Roche, Mannheim) při teplotě 37 °C (30 minut). Nukleotidy se vyjmou extrakcí systémem fenol/chloroform a za použití sloupců Sephadex G50. Adaptery EcoRI/XhoI (Pharmacia, Freiburg, Německo) se vážou na konce cDNA pomocí ligázy T4 DNA (Roche, 12 °C, přes noc), oddělí se XhoI a fosforylují se inkubací s polynukleotidkinázou (Roche, 37 °C, 30 minut). Tato směs se podrobí separaci na agarovém gelu s nízkou teplotou tání. Z gelu se eluují molekuly DNA v množství více než 300 párů bází, extrahují se fenolem, zkoncentrují se na sloupcích Elutip D (Schleicher a Schüll, Dassel, Německo), vážou se na ramena vektoru a zabalí se do lambda-ZAPII fágů a lambda-ZAP-expressních fágů za použití kitu Gigapack Dold kit (Stratagene, Amsterdam, Nizozemsko) za použití výrobcova materiálu a podle jeho instrukcí.

Konstrukce knihovny cDNA pro *Phytophthora infestans* se provede jak shora popsáno.

Příklad 5

Sekvencování DNA a analýsa pomocí počítače

K sekvencování DNA se použije knihoven cDNA popsaných v příkladu 4 o sobě známými způsoby, zejména způsobem ukončování řetězce za použití kitu "ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt, Německo). Po přípravě plasmidu z knihoven cDNA se sekvencují individuální nahodilé klony cestou in-vivo hmotovou excisí po retransformování DH10B na agarových destičkách (podrobnosti o materiálu a protokolu: Stratagene, Amsterdam, Nizozemsko).

Plasmidová DNA se připraví z kultur E.coli rostoucích přes noc v živném roztoku Luria doplněném ampicillinem (Sambrook a kol., Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6, 1989) za použití jednotky moci Qiagen DNA preparation robot (Qiagen, Hilden) podle návodu výrobce. Použije se sekvencování primerů s následujícími nukleotidovými sekvencemi:

5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'

5'-CTAAAGGGAACAAAAGCTG-3'

5'-TGTA AACGACGGCCAGT-3'

Sekvence se zpracují a zaznamenají za použití programu "EST-MAX standard software package", (obchodní produkt společnosti Bio-Max, Mnichov, Německo). S využitím komparativních algoritmů a za použití hledací sekvence, se vyhledají homologické geny pro použití BLAST programu (Altschul a kol. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25, str. 3389 až 3402, 1997). Jedna sekvence z *Crypthecodinium* a z *Thraustochytrium* s homology s hledanou sekvencí mechové elongázy *Physcomitrella patens* je charakterizována podrobněji.

Příklad 6 a

Identifikace genu TC_PSE1 a Tc_PSE2 (Tc=*Thraustochytrium*) a genu Cc_PSE1 a Cc_PSE2 (Cc = *Crypthecodinium cohnii*) porovnáním s *Physcomitrella patens* genu Pp_PSE1.

Plná délka sekvence Pp_PSE1 mechové elongázy podle vynálezu (jméno: viz též tabulku II) se použije pro porovnání sekvencí v pátracím algoritmu TBLASTN:

MEVVERFYGE LDGKVSQGVN ALLGSFGVEL TDTPTTKGLP LVDSPTPIVL GVSVYLTIVI
GGLLWIKARD LKPRASEPFL LQALVLVHNL FCFALSLYMC VGIAYQAITW RYSLWGNAYN
PKHKEMAILV YLFYMSKYVE FMDTVIMILK RSTRQISFLH VYHHSSISLI WWAIAHHAPG
GEAYWSAALN SGVHVLMYAY YFLAACLRSS PKLKNKYLFW GRYLTQFQMF QFMLNLVQAY
YDMKTNAPYP QWLIKILFY Y MISLLFLFGN FYVQKYIKPS DGKQKGAKTE.

Úplná nukleotidová sekvence mechové elongázy Pp_PSE1 cDNA se skládá z přibližně 1200 bp. Obsahuje otevřený čtecí rámec 873 bp, který kóduje 290 aminokyselin s vypočtenou molekulovou hmotností 33,4 Da. Proteinová sekvence má pouze 38,5% identitu a 48,3% podobnost s genovým produktem *Saccharomyces cerevisiae* například s genovým produktem *Saccharomyces cerevisiae* PSE1, kterého je třeba v kvasnicích k prodloužení řetězce mastných kyselin se střední délkou řetězce (Toke & Martin, Isolation and characterization of gene affecting fatty acid elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 271, str. 18413 až 18422, 1996).

Sekvence EST CC001042041R, TC002034029R a TC002014093R byly zprvu považovány za cílový gen mezi jinými genovými kandidáty díky zpočátku slabým homologiím s elongázou *Physcomitrella patens* (tabulka II), genu PSE1. Na obr. 5 je výsledek porovnání peptidové sekvence Pp_PSE1 s nalezenou sekvencí. Je to část nukleové kyseliny SEQ ID NO:3 podle vynálezu (genové jméno TcPSE1, číslo databáze podle vynálezu TC 002034029R). Písmena značí identické aminokyseliny, zatímco symbol + značí chemicky podobnou aminokyselinu. Identity a homologie všech nalezených sekvencí podle vynálezu jsou souhrnně uvedeny v tabulce III.

Sekvencování úplného fragmentu cDNA z klonu TC002034029R vede k sekvenci 693 párů bází začínající první bází v otevřeném čtecím rámci. Sekvence kóduje polypeptid 195 aminokyselin v SEQ ID NO:4 s koncovým kódonem v poloze párů bází translatované ze SEQ ID NO:3 v podloze párů bází 586 až 588. Klon TC002014093R představuje virtuálně úplný elongázový polypeptid, jak možno vidět ze souboru sekvencí na obr. 7. Řádky znamenají identické aminokyseliny, zatímco sloupce a tečky znamenají chemicky zaměnitelné, tedy chemicky ekvivalentní aminokyseliny. Seřazení je provedeno pomocí Henikoff & Henikoffovy substituční matrice BLOSUM62 aminokyselin (Amino acid substi-

tution matrices from protein blocs. Proc. Natl. Acad. Sci, USA 89, str. 10915 až 10919, 1992). Použité parametry: Gap Weight:8, Average match: 2.912, Length Weight:2, Average Mismatch:-2.003.

Kromě toho je druhá EST identifikována seřazením sekvencí. Seřazení peptidové sekvence Pp_PSE1 s nalezenou sekvencí je na obr. 6. I když je homologie mezi volenými parametry omezena na několik aminokyselin, jde o vysoce konzervovaný region specifických elongáz PUFA. Sekvence úplného klonovaného fragmentu je proto stanovena.

Sekvencování úplného fragmentu cDNA klonu TC002014093R vede k sekvenci 955 párů bází začínající první bází v otevřeném čtecím rámci. Jde o SEQ ID NO:5 podle vynálezu. Sekvence kóduje polypeptid 297 aminokyselin se stop kódou v poloze 892 až 894 párů bází podle vynálezu v SEQ ID NO:6.

Crypthecodinium cohnii EST CC001042041R, které kóduje gen Cc_PSE1 se identifikuje pomocí sekvence PpPSE1. Izolovaná EST CC001042041R označovaná podle vynálezu jako SEQ ID NO:7, je dlouhá 708 párů bází a má otevřený čtecí rámec 642 párů bází z první báze, která kóduje 214 aminokyselin a má stop kódou v poloze 643 až 645. Sekvence aminokyselin až do stop kódu je podle vynálezu SEQ ID NO:8.

Vedle podobnosti s produktem genu PSE1 může být podobnost s elongázou *Saccharomyces cerevisiae* (viz též 1P), které je třeba v kvasnicích k prodloužení řetězce mastných kyselin se střední délkou řetězce (Toke & Martin, Isolation and characterization od gene affecting fatty acid elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry 271, str. 18413 až 18422, 1996). Tabulka III ukazuje identity a homologie elongáz podle vynálezu s ostatními elongázami a s elongázami *Physcomitrella patens* a s kvasnicovými elongázami. Data

jsou získána pomocí GAP programu jako subprogramu následujících softwarů: Wisconsin Package Version 10,0 (Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc., Sp. st. a.).

Tabulka III

Identit- ty/ homology	Tc_PSE1	TC_PSE2	Pp_PSE1	Sce elo 1P
Cc_PSE1	47.1% / 40.2%	50.6% / 43.5%	38.5% / 29.4%	45.1% / 33.5%
Tc_PSE1	100 / 100	n.d.	43.2% / 32.7%	41.9% / 29.9%
Tc_PSE2	41.7% / 29.5%	100 / 100	39.2% / 30.0	35.4% / 27.8%

Zejména může být použito příkladů 5 až 10 k odvození následujících sekvenčních motivů jako regionů s vysokou homologií a odpovídajících dohodnutých sekvencí, z nich odvozených, které při zpětné translaci aminokyselin do kódonů se třemi páry bází vedou k oligonukleotidům, kterých lze využít k izolaci nových elongáz pomocí polymerázové řetězcové reakce. Jsou to hlavně sekvenční motivy znázorněné na obr. 10. Těchto motivů je možno použít k odvození oligonukleotidů, které, v kombinaci se dvěma oligonukleotidy, mohou být použity v pokusech PCR k izolování dalších elongázových fragmentů. K tomu je nutno zkonstruovat a syntetizovat jeden oligonukleotid hodící se k běžně definovanému kmeni 5'-3' a druhý oligonukleotid ladící s oligonukleotidovým kmenem 3'-5' ve směru. To vede k definovatelnému počtu primerových kombinací, který je omezen permutací možných variant.

V této souvislosti je možno využít také primerů oligo-dT a jejich variant, například poslední bází umožňující specifičnost pro transkripční soubor, jako je například oligo dT (12-20) X, kde X může být G, C nebo T. Také oligo dT (12-20) druhé báze XY je možno použít, kde X může být G, C a/nebo A,

zatímco Y může být A, G, C nebo T.

Uvedené sekvence umožňují odvodit 17 až 20 oligonukleotidů, kterých je možno použít k izolování genových fragmentů měněním primerových kombinací a parametrů pokusů, jako jsou teplotní program, koncentrace iontů hořčíku a podobné parametry. Výsledné fragmenty je možno klonovat do vhodných vektorů a sekvence rezultujících klonů může být určena běžnými způsoby k definování nových elongáz.

Příklad 6b

Izolace klonu cDNA z *Phytophthora infestans*

Klon cDNA označený PI001002014R z *Phytophthora infestans* se identifikuje z cDNA sekvencovaných nahodile, použitím homologii k elonáze PUFA z *Physcomitrella patens* mechu (ATCCC 48886). Klón obsahuje dohodnutý motiv MyxYYF znázorněný na obr. 8, kde odlišně od elongáz PUFA, které byly dosud identifikovány, je threoninový radikál nalezen jako variabilní aminokyselina x. Této další variace je možno použít k odvození primerů PCR.

Příklad 7

Identifikace genů pomocí hybridizace (TC002034029R-11 iGentC-PCE1)

Genových sekvencí je možno použít k identifikaci homologových nebo heterologových genů z knihoven cDNA nebo z genomových knihoven .

Homologové geny (například klony cDNA v úplné délce, které jsou homologové, nebo homology) mohou být izolovány pomocí hybridizace nukleové kyseliny, s použitím například knihoven

cDNA; Způsobu může být použito zejména k izolování funkčně aktivních genů v plné délce SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:11. V závislosti na frekvenci sledovaného genu se nanese 100000 až 1 000000 rekombinantních bakteriofágů a přenesou se na nylonovou membránu. Po denaturaci alkálií je DNA imobilizována na membráně, například UV zesílením. Hybridizace se provádí za vysoce přísných podmínek. Hybridizace a promytí probíhá ve vodném roztoku s iontovou sílou 1M NaCl při teplotě 68 °C. Hybridizační vzorky se generují například značením radioaktivním (³²P-) nick transkripcí (High Prime, Roche, Mannheim, Německo). Signály se snímají autoradiograficky.

Parciální homologové nebo heterologové geny, které mají vztah nejsou však identické, se mohou identifikovat obdobně jako shora popsáno za použití mírně přísných podmínek hybridizace a promývání. Pro vodnou hybridizaci se iontová přísnost zpravidla udržuje při 1 M chloridu sodném a teplota se sníží postupně na 68 až 42 °C.

Izolace genových sekvencí, která jediné exhibuje homologie s individuální doménou například s 10 až 20 aminokyselinami se může provádět za použití syntetických, radioznačených oligonukleotidových sond. Radioznačené oligonukleotidy se generují fosforylací 5' zakončení dvou komplementárních oligonukleotidů za použití T4 polynukleotidkinázy. Komplementární oligonukleotidy se hybridizují a ligují navzájem za zvyšování konkatemerů. Doušroubcovicové konkatemery se radioaktivně značí například zlomovou transkripcí. Hybridizace se zpravidla provádí za mírně přísných podmínek za použití vysokých koncentrací oligonukleotidů.

Oligonukleotidový hybridizační roztok

6 x SSC

0,01 M fosforečnan sodný
1mM EDTA (hodnota pH 8)
0,5 % SDS
100 µg/ml denaturovaného lososového sperma DNA
0,1 % sušeného nízkotučného mléka

V průběhu hybridizace se teplota postupně sníží na 5 až 10 °C pod vypočtenou oligonukleotidovou teplotu nebo na teplotu místnosti (pokud není uvedeno jinak, teplota místnosti -23 °C ve všech pokusech), následují stupně promývání a autoradiografie. Promývání se provádí za mimořádně nízké přísnosti, například třemi promývacími stupni za použití 4 x SSC. Podrobnosti jsou popsány v literatuře (Sambrook J. a kol., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; nebo Ausubel F.M. a kol., "Current Protocols in Molecular Biology", John Willy & Sons, 1994).

Klon TC002034029R-11 genového jména Tc_PCE1_1 je sekvence plné délky elongázy z organismu Thraustochytrium a proto delší než klon TC002034029R ze sekvence SEQ ID NO:4. Klon se izoluje hybridizačním způsobem, jak shora popsáno (příklad 7). Je to DNA sekvence délky 1050 párů bází, kódující 271 aminokyselin majících startovací kodon v pozici párů bází 43-45 a stop kodon v pozici párů bází 856-858.

Příklad 8

Identifikace cílových genů skrínováním expresních knihoven za použití protilátek

Pro generaci rekombinantního proteinu například v E. coli se používají cDNA sekvence (například systém Qiagen QIAexpress pQE). Rekombinantní proteiny se pak afinitně čistí zpravidla afinitní Ni-NTA chromatografií (Qiagen). Rekombinantní proteiny se pak používají pro zvýšení specifických protilátek

například za použití o sobě známých technik pro imunizaci králíků. Protilátky se pak afinitně čistí za použití Ni-NTA sloupce, který je předem nasycen rekombinantním antigenem (Gu a kol., *BioTechniques* 17, str. 257 až 262, 1994). Protilátka se pak používá pro skrínování exprese cDNA knihoven imunologickým skrínováním popsaným v literatuře (Sambrook J. a kol., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; nebo Ausubel F.M. a kol., "Current Protocols in Molecular Biology" John Wiley & Sons, 1994).

Příklad 9

Plasmidy pro transformaci rostlin

Binární vektory jako pBinAR se mohou používat pro transformaci rostlin (Höfgen a Willmitzer, *Plant Science* 66, str. 221 až 230, 1990). Binární vektory se mohou konstruovat ligací cDNA ve smyslové nebo v antismyslové orientaci do T-DNA. 5' cDNA, rostlinný promotor aktivuje cDNA transkripci. Polyadenylační sekvence je umístěna na 3' cDNA.

Pro tkáň specifické exprese se může dosáhnout za použití pro tkáň specifického promotoru. Například pro semeno specifické exprese se může dosáhnout klónováním do napinu nebo LeB4 nebo USP promotoru 5' cDNA. Může se také použít jakýkoliv jiný pro semeno specifický promotorový element. Promotor CaMV-35S se může použít pro konstitutivní expresi ve všech rostlinách.

Expresovaný protein se může cílit do buněčného prostoru za použití signálního peptidu, například pro plastidy, mitochondrie nebo endoplasmatické reticulum (Kermode, *Crit. Rev. Plant Sci.* 15, 4, str. 285 až 423, 1996). Signální peptid se klónuje do 5' ve správném čtecím rámu s cDNA k dosažení subcelulární lokalizace fúzního proteinu.

Příklad 10

Transformace Agrobacteria

Agrobacteriem zprostředkovávaná transformace rostlin se může provádět například za použití kmene *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pmP90) (Konz a Schell, *Mol. Gen. Genet.* 204, str. 383 až 396, 1986) nebo LBA4404 (Clontech). Transformace se může provádět o sobě známými transformačními způsoby (Deblaere a kol., *Nucl. Acids. Res.* 13, str. 4777 až 4788, 1984).

Příklad 11

Transformace rostlin

Agrobacteriem zprostředkovávaná transformace rostlin se může provádět o sobě známými způsoby transformace a regenerace (Gelvin Stilton B., Schilperoort Robert A., *Plant Molecular Biology Manual*, 2. vydání, Dordrecht: Kluwer Academic Publ., sekce, Ringbuc Centrale Signatur: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick Bernard R., Thompson John E., *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Boca Raton: CRC Press, 360 stran, 1993, ISBN 0-8493-5164-2).

Například řepka olejka se může transformovat za použití kotyledonové nebo hypokotyledonové transformace (Moloney a kol., *Plant Cell Report* 8, str. 238 až 242, 1989; De Block a kol., *Plant Physiol.* 91, str. 694 až 701, 1989). Použití antibiotik pro selekci agrobakteria a rostlin závisí na binárním vektoru a na agrobakteriálním kmenu použitém pro transformaci. Selektace řepky olejky se zpravidla provádí za použití kanamycinu jako selektovatelného signálního znaku.

Agrobacteriem zprostředkovávaný genový transfer v lněném

semínku (*Linum usitatissimum*) se může provádět například za použití způsobu, který popsal Mlynarova a kol., (Plant Cell Report 13, str. 282 až 285, 1994).

Transformace sojy se může provádět například způsobem, který je popsán v evropském patentovém spise číslo EP-A-O 424047 (Pioneer Hi-Bred International) nebo v evropském patentovém spise číslo EP-A-O 397687, a v amerických patentových spisech číslo US 5 376543 a US 5 169770 (Univerzity of Toledo).

Rostlinovou transkripci za užití bombardování částicemi, zprostředkovanou polyethylenglykolem DNA absorpcí nebo technikou silikonkarbonátového vlákna popsal Freeling a Walbot ("The maize handbook", ISBN 3-540-97826-7, Springer Verlag New York, 1993).

Příklad 12

Plasmidy pro transformaci rostlin

Binární vektory, jako pBinAR, se mohou použít pro transformaci rostlin (Höfgen a Willmitzer, Plant Science 66, str. 221 až 230, 1990). Binární vektory se mohou konstruovat ligací cDNA ve smyslové nebo v antismyslové orientaci do T-DNA. 5' cDNA rostlinný promotor aktivuje cDNA transkripci. Polyadenylační sekvence je lokalizovaná na 3' cDNA. Pro tkáň specifické exprese se může dosáhnout za použití pro tkáň specifického promotoru. Například pro semeno specifické exprese se může dosáhnout klónováním do napinu nebo do LeB4 nebo USP promotoru 5' cDNA. Jakýkoliv jiný pro semeno specifický promotorový element se rovněž může použít. Promotor CaMV-35S se může použít pro konstitutivní expresi v každé rostlině. Zvláště geny kódující elongázy a desaturázy se mohou klónovat do binárního vektoru konstrukcí četných expresních kazet v následnosti k imitaci metabolické cesty v rostlině.

V expresní kasetě se expresovaný protein může cílit do buněčného prostoru za použití signálního peptidu, například plastidu, mitochondrie nebo endoplasmatického reticula (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. A5, 4, str. 285 až 423, 1996). Signální peptid se klónuje 5' ve správném čtecím rámci s cDNA k dosažení subcelulární lokalizace fúzního proteinu.

Příklad 13

In vivo mutageneze

In vivo mutageneze mikroorganismů se může provádět vedením plasmidu DNA (nebo jiného vektoru DNA) cestou *E. coli* nebo jiných mikroorganismů (například *Bacillus* spp nebo kvasinky jako *Saccharomyces cerevisiae*), ve kterých schopnost podržení integrity genetické informace je narušena. Konvenční mutátorové kmeny mají mutace v genech pro DNA opravného systému (například *mutHLS*, *mutD*, *mutT*, Rupp W.D., DNA repair mechanisms in: *Escherichia coli* and *Salmonella*, str. 2277 až 2294, ASM: Washington, 1996). Tyto kmeny jsou pracovníkům v oboru známy. Použití těchto kmenů objasnil například Greener A. a Callahan M. (*Strategies* 7, str. 32 až 34, 1994). Mutované DNA molekuly se s výhodou transferují do rostlin po té, co byly mikroorganismy selektovány a testovány. Transgenní rostliny se generují podle různých příkladů uváděných zde ve stati příkladů praktického využití.

Příklad 14

Studie exprese rekombinantního genového produktu v translatovaných organizmech

Aktivita rekombinantního genového produktu v transformovaném hostitelkém organismu se měří na transkripční a/nebo translační úrovni.

Vhodným způsobem stanovení množství transkripce genu (které indikuje množství RNA dostupné pro translaci genového produktu) se provádí na northern blot, jak je níže objasněno (Ausubel a kol., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley: New York 1988 a shora uvedené příklady), přičemž primer, který je určen tak, aby se vázal na příslušný gen, se značí detekovatelným značením (například radioaktivitou nebo chemiluminescencí) takže, když celá RNA kultury organismu se extrahuje, separuje na gel, transferuje na stabilní matrici a inkubuje touto sondou, váže se a rozsah vázání sondy indikuje přítomnost jakož také množství mRNA pro tento gen. Informace indikuje stupeň transkripce transformovaného genu: celková buněčná RNA se může připravit z buněk, tkání nebo orgánů četnými způsoby, které jsou všechny pracovníkům v oboru známy, jako je například Bormannův způsob (Bormann E.R. a kol., Mol. Microbiol. 6, str. 317 až 326, 1992).

Hybridizace Northern

Pro RNA hybridizaci 20 μ g celkové RNA nebo 1 μ g poly(A)⁺-RNA se oddělí gelovou elektroforézou v 1,25% agarovém gelu za použití formaldehydu způsobem, který popsal Amasino (Anal. Biochem. 152, str. 304, 1986), transferovaného na nylonové membrány s pozitivním nábojem (HybondN+, Amersham, Brunswick) kapilární atrakcí za použití 10 x SSC, imobilizovaného UV světlem a předhybridizovaného po dobu tří hodin při teplotě 68 °C za použití hybridizačního pufru (10% dextransulfát (hmotnost/objem), 1 M NaCl, 1 % SDS, 100 mg herinkového sperma DNA). Sonda DNA se značí za použití značícího kitu Highprime DNA (Roche, Mannheim, Německo) v předhybridizačním stupni za použití α -³²P-dCTP (Amersham, Brunswick, Německo). Hybridizace se provádí po přidání značené DNA sondy v témže pufru při teplotě 68 °C přes noc. Promývací stupeň se provádí dvakrát po dobu 15 minut za použití 2 x SSC a dvakrát po dobu 30 minut za použití 1 x SSC, 1 % SDS při teplotě 68 °C. Utěsněné filtry se

exponují při teplotě -70°C po dobu jednoho až 14 dní.

O sobě známé způsoby, jako je například Western blot (například Ausubel a kol., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley: New York, 1988) se mohou použít pro studium přítomnosti nebo relativního množství proteinu translatovaného touto mRNA. Podle tohoto způsobu se extrahují celkové buněčné proteiny, dělí se gelovou elektroforézou, transferují se na matrici, jako je nitrocelulóza, a inkubují se se sondou, jako je protilátka, která specificky váže žádaný protein. Tato sonda je zpravidla vybavena chemoluminiscenčním nebo kolorimetrickým značením, které se může snadno zjišťovat. Přítomnost a množství přítomného značení naznačuje přítomnost a kvantitu žádaného mutovaného proteinu obsaženého v buňce.

Příklad 15

Analýza vlivu rekombinantních proteinů na produkci žádaného produktu

Vliv genetické modifikace v rostlinách, houbách, řasách, ciliates nebo na produkci žádané sloučeniny (jako je například mastná kyselina) se může stanovit růstem modifikovaných organismů nebo modifikovaných rostlin za vhodných podmínek (například shora popsaných) a analýzou prostředí a/nebo buněčných složek se zřetelen na zvýšenou produkci žádaného produktu (to je lipidů nebo mastné kyseliny). Tyto analytické způsoby jsou pracovníkům v oboru známy a zahrnují spektroskopii, chromatografii v tenké vrstvě, různé zbarvovací způsoby, enzymatické a mikrobiologické způsoby a analytickou chromatografii, jako je vysokovýkonná kapalinová chromatografie (například Ullman, *Encyclopedia of Industrial Chemistry*, svazek A2, str. 89 až 90 a 443 až 613, VCH Weinheim, 1985; Fallon A. a kol., "Application of HPLC in Biochemistry", *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, svazek 17,

1987; Rehm a kol., Biotechnology, svazek 3, kapitola III, "Product recovery and purification" str. 469 až 714, VCH Weinheim, 1993; Belter P.A. a kol., Bioseparations: downstream processing for Biotechnology, John Wiley & Sons, 1988; Kennedy J.F. a Cabral J.M.S., Recovery Processes for biological Materials John Wiley & Sons, 1992; Shaeiwitz J.A. a Henry J.D. Biochemical Separations, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, svazek B3, kapitola 11, Vol. 1-27, VCH Weinheim 1988; a Dechow F.J., Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications 1989).

Kromě shora uvedených způsobů se rostlinné lipidy extrahují z rostlinného materiálu způsobem, který popsal Cahoon a kol. (Proc. Natl. Acad. Sci USA 96 (22), str. 12935 až 12940, 1999) a Browse a kol. (Analytic Biochemistry 152, str. 141 až 145, 1986). Kvalitativní a kvantitativní analýza lipidu nebo mastné kyseliny je popsána v literatuře (Christie William W., Advances in Lipid Methodology, Ayr/Skotsko: Oily Press (Oily Press Lipid Library; 2); Christie William W., Gas Chromatography and Lipids, A Practical Guide - Ayr/Skotsko: Oily Press, 1989, Repr. 1992 IX, 307 stran (Oily Press Lipid Library; 1); "Progress in Lipid Research, Oxford: Pergamon Press, 1 (1952), 16 (1977) pod názvem: Progress in Chemistry and Fats and Other Lipids CODEN).

Kromě zjišťování konečného produktu při fermentaci je také možné zjišťovat jiné složky metabolické cesty, které se používají pro výrobu žádané sloučeniny, jako meziprodukty a vedlejší produkty ke stanovení celkové produkční účinnosti sloučeniny. Analytické způsoby zahrnují měření množství živin v prostředí (například cukrů, glycidů, zdrojů dusíku, fosfátu a jiných iontů), složení biomasy a růstu, analýzu produkce běžných metabolitů biosyntetické cesty a měření plynů, které se vyvíjejí při fermentaci. O sobě známé způsoby pro tato měření jsou popsány v literatuře (Applied Microbial Physiology: A practi-

13.07.02

cal Approach, P.M. Rhodes and P.F. Stanbury, vyd. IRL Press, str. 131 až 163 a 165 až 192 (ISBN: 0199635773, a tam uvedené odkazy na literaturu).

Jakožto příklad se uvádí analýza mastných kyselin (zde označovaných jako FAME, ["fatty acid methyl ester"]; GC/MS, plynově-kapalinová chromatografie/hmotová spektrometrie; TAG, triacylglycerol; TLC, chromatografie v tenké vrstvě).

Jednoznačná detekce přítomnosti produktů mastných kyselin je možná analýzou rekombinantních organismů o sobě známými analytickými způsoby: GC, GC/MS nebo TLC, které popsal Christie William W. (Advances on Lipid Methodology, 4. vydání: Christie, Oily Press, Dundee, str. 119 až 169, 1997 a připojené odkazy na literaturu; gas chromatography/ mass spectrometry methods, Lipide 33, str. 343 až 353, 1998).

Analyzovaný materiál se může rozrušit sonizací, mletím ve skleněném mlýnu, kapalným dusíkem a mletím nebo jinými použitelnými způsoby. Po rozrušení se materiál musí odstředit. Sediment se resuspenduje v destilované vodě, udržuje se zahříváním na teplotě 100 °C po dobu jedné hodiny, ochladí se ledem a opět se odstředí, následně se extrahuje 0,5 M kyselinou sírovou v methanolu s 2 % dimethoxypropanu po dobu jedné hodiny při teplotě 90 °C, čímž dojde k hydrolýze olejových a lipidových sloučenin za získání transmetylovaných lipidů. Tyto methylestery mastné kyseliny se extrahují petroletherem a nakonec se podrobují plynové chromatografii za použití kapilárního sloupce (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 µm, 0,32 mm) za teplotního gradientu 170 až 240 °C po dobu 20 minut a 5 minut při teplotě 240 °C. Identita rezultujícího methylesteru mastné kyseliny se musí definovat za použití standardů, které jsou obchodně dostupné (Sigma).

V případě mastných kyselin, pro které nejsou dostupné

18.07.02

žádné standardy, se identita musí doložit derivatizací následovanou analýzou GC/MS. Například lokalizace mastných kyselin se trojnou vazbou se musí demonstrovat GC/MS následovanou derivatizací se 4,4-dimethoxyoxazolinovými deriváty (Christie, 1998, viz shora).

Příklad 16

Expresní konstrukty v heterologových mikrobiálních systémech

Kmeny, podmínky růstu a plasmidy

Kmen *Escherichia coli* XL1 Blue MRF' kan (Stratagene) se používá pro subklonování nových *Physcomitrella patens* elongáz, například PpPSE1. Pro funkční expresi tohoto genu se použil kmen *Saccharomyces cerevisiae* INVSc 1 (Invitrogen Co.). *E. coli* se kultivuje při teplotě 37 °C v půdě Luria-Bertini (LB, Duchefa, Haarlem, Holandsko). Popřípadě se přidává ampicillin (100 mg/l) a 1,5% (hmotnost/objem) agar pro pevné LB prostředí. *S. cerevisiae* se kultivuje při teplotě 30 °C buď v prostředí YPG nebo v kompletním minimálním prostředí bez uracilu (CNdum, Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K., Albright L.B., Coen D.M. a Varki A., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1995) spolu se 2% (hmotnost/objem) buď rafinózy nebo glukózy. Do pevného prostředí se přidají 2% (hmotnost/objem) Bato™ agaru (Difco). Použitými plasmidy pro klonování a expresi jsou PUC18 (Pharmacia) a pYES2 (Invitrogen Co.).

Příklad 17

Klónování a exprese PUFA-specifických elongáz organismů *Physcomitrella*, *Cryptocodium* a *Thraustochytrium*

18.07.02

Geny o plné délce sekvencí podle vynálezu se mohou izolovat způsobem popsaným v příkladu 7 a zpracovávat, jak níže uvedeno. Se zřetelem na použití jsou uvedeny konkrétní příklady exprese.

A. Elongace mastných kyselin elongázou Pp_PSE1 z mechu

Pro expresi kvasinek *P. patens* cDNA klony PpPSE1 (sekvenční jméno dřívější databáze: O8ck19b07, nové jméno: pp001019019f), které kódují PUFA specifický elongázový gen (PSE1) se nejdříve modifikuje tak, že se získá BamHI restriční místo a konsenzní sekvence kvasinek pro vysoce efektivní translaci (Kozak M., Point mutation define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes, Cell 44, str. 283 až 292, 1986) po startujícím kodonu a BamHI restriční místo se získá lemováním stop kodonu. K zesílení otevřeného čtecího rámce se syntetizuje primerový pár, který je komplementární na své 5' a 3' zakončení.

Gen sekvence podle vynálezu v SEQ ID NO:1 se kluje do pYES polymerázovou řetězovou reakcí, čímž se vytvoří plasmid pYPPSE 1:

Následující oligonukleotidy se používají pro PCR experiment:

Ppex6: ggatccacataatggaggtcgtggagagattc
Ppex6r: ggatcctcactcagtttagctccttttgc

Reakce PCR se provádí s plasmidem DNA klonu PP001019019F jakožto matricí v jednotce thermocycler (Biometra) s Pfu DNA (Stratagene) polymerázou a za následujícího teplotního programu: 3 minuty při teplotě 96 °C, následně 25 cyklů 30 sekund při teplotě 96 °C, 30 sekund při teplotě 55 °C a 1 minuta při teplotě 72 °C, 1 cyklus po dobu 10 minut při teplotě 72 °C.

Správná velikost zesíleného DNA fragmentu se potvrdí agarovou TBE gelovou elektroforézou. Zesílená DNA se extrahuje z gelu za použití QIAquick gelového extrakčního kitu (Quiagen) a zpočátku se klonuje do PUC18 za použití kitu Sure Clone Ligation Kit (Pharmacia). Takto klonovaný fragment se odřízne s BamHI a liguje se do pYES, čímž vznikne pYppPSE1. Fragmentová orientace se zkouší za použití HindIII. Po transformaci E. coli XL1 Blue MRF' kan se provádí mikropreparace DNA (Riggs M.G. & McLachlan A., A simplified screening procedure for large number of plasmid mini-preparation. BioTechniques 4, str. 310 až 313, 1986) transformantů a pozitivní kmeny se identifikují restriční analýzou BamHI. Sekvence PCR produktu se potvrdí resequencováním za použití kitu ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt).

Jeden klon se nechá růst za použití extrakčního kitu Nucleobond[®] AX 500 plasmidu DNA (Macherey-Nagel, Düringen) pro maxipreparaci DNA.

Saccharomyces INVSc1 se transformuje za použití pYpp_PSE1 nebo pYES2 jako kontroly podle modifikovaného PEG/lithiumacetátového protokolu (Ausubel a kol., 1995). Po selekci na CMdum-agarových destičkách se 2 % glukózy se selektují transformanty pro další kultivaci a funkční expresi jak shora uvedeno, a zavádějí se různé mastné kyseliny do prostředí.

i)

Lipidové vzory kvasinek transformovaných za použití pYES plasmidu bez inzerce fragmentu nebo které expresují Pp-PSE1 gen (hodnoty v mol procentech) po zavedení 250 μ m hexadekatrienové kyseliny (16:3^{n-7c, 10c, 13c}).

18.07.02

Tabulka IV

PYES2	PYES2	pYPP_PSE1	PYPP_PSE1
16:0	11,8%	16:0	11,1%
16:1	28,7%	16:1	23,9%
16:3 ^{Δ7c,10c,13c}	9,2%	16:3 ^{Δ7c,10c,13c}	12,0%
18:0	10,6%	18:0	8,6%
18:1 ^{Δ9c}	34,9%	18:1 ^{Δ9c}	20,6%
18:1 ^{Δ11c}	1,1%	18:1 ^{Δ11c}	1,4%
18:3 ^{Δ9c,12c,15c}	3,7%	18:3 ^{Δ9c,12c,15c}	21,4%

ii)

Lipidové vzory kvasinek transformovaných za použití pYES plasmidu bez inserce fragmentu nebo které expresují Pp-PSE1 gen (hodnoty v mol procentech) po zavedení 500 μm pinolenové kyseliny (18:3^{Δ6c,9c,12c}).

Tabulka V

PYES2	PYES2	pYPP_PSE1	PYPP_PSE1
16:0	18,3%	16:0	16,9%
16:1 ^{Δ9c}	16,0%	16:1 ^{Δ9c}	15,3%
18:0	8,6%	18:0	8,4%
18:1 ^{Δ9c}	16,7%	18:1 ^{Δ9c}	17,5%
18:1 ^{Δ11c}	0,7%	18:1 ^{Δ11c}	2,0%
18:3 ^{Δ5c,9c,12c}	39,8%	18:3 ^{Δ5c,9c,12c}	32,6%
20:3 ^{Δ7c,11c,14c}	0%	20:3 ^{Δ7c,11c,14c}	5,1%

iii)

Lipidové vzory kvasinek transformovaných za použití pYES plasmidu bez inserce fragmentu nebo které expresují Pp-PSE1 gen (hodnoty v mol procentech) po zavedení 500 μm stearidonové kyseliny (18:4^{Δ6c,9c,12c,15c}).

18.07.02

Tabulka VI

PYES2	pYES2	pYPP_PSE1	PYPP_PSE1
16:0	15,2%	16:0	15,6%
16:1 ^{Δ9c}	13,1%	16:1 ^{Δ9c}	14,9%
18:0	12,3%	18:0	10,7%
18:1 ^{Δ9c}	12,9%	18:1 ^{Δ9c}	14,0%
18:1 ^{Δ11c}	0,7%	18:1 ^{Δ11c}	1,2%
18:3 ^{Δ6c,9c,12c,15c}	45,4%	18:3 ^{Δ6c,9c,12c,15c}	23,8%
20:4 Δ8c,11c,14c,17c	0,4%	20:4 Δ8c,11c,14c,17c	19,8%

iv)

Lipidové vzory kvasinek transformovaných za použití pYES plasmidu bez inserce fragmentu nebo které expresují Pp-PSE1 gen (hodnoty v mol procentech) po zavedení 500 μm linolové kyseliny (18:2^{Δ9c,12c}).

Tabulka VII

pYES2	pYES2	pYPP_PSE1	PYPP_PSE1
16:0	7,9%	16:0	8,7%
16:1 ^{Δ9c}	1,2%	16:1 ^{Δ9c}	1,3%
18:0	5,3%	18:0	5,1%
18:1 ^{Δ9c}	1,3%	18:1 ^{Δ9c}	1,3%
18:2 ^{Δ9c,12c}	83,9%	18:2 ^{Δ9c,12c}	80,4%
20:2 ^{Δ11c,14c}	0,5%	20:2 ^{Δ11c,14c}	3,2%

B) Elongace mastných kyselin elongázou *Thraustochytrium*

Pro expresi v kvasinkách se *Thraustochytrium* cDNA klon sekvence SEQ ID NO:3 (TcPSE2), který kóduje PUFA specifický elongázový (PSE) gen nejdříve modifikuje tak, že tvoří funkčně aktivní polypeptid. K tomuto účelu se N-zakončení proteinu elonguje na úřpvní DNA 43 páry bází za chybění několika bází elongázy *Physcomitrella patens*. Je však také možné pouze přidat startující kodonve správném čtecím rámci pro sekvenci.

Následující oligonukleotidy se používají pro PCR experiment:

pTCPSE2-5':

aaaggatccacataatggaggtcgtggagagattctacgggtgagttggatggga

agGTCATTTCCGGGCCTCGACC

pTCPSE2-3': aaggatccctgagtttttagctcccttttgctttcc

Oba nukleotidy obsahují BamHI restrikční místo a kvasinkovou konsenzovou sekvenci pro vysoce účinnou translaci (Kozak M., Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes, Cell, 44, str. 283 až 292, 1986).

PCR reakce se provádí s plamidem DNA jakožto matricí v jednotce thermocycler (Biometra) s Pfu DNA (Stratagene) polymerázou a za následujícího teplotního programu: 3 minuty 96 °C následované 25 cykly trvajících 30 sekund při teplotě 96 °C, 30 sekund při teplotě 55 °C a 3 minuty při teplotě 72 °C, 1 cyklus trvajících 10 minut při teplotě 72 °C a stop při teplotě 4 °C.

Správná velikost zesíleného DNA fragmentu se potvrdí agarovou TBE gelovou elektroforézou. Zesílená DNA se extrahuje z gelu za použití QIAquick gelového extrakčního kitu (Quiagen) a zpočátku se klonuje do PUC18 za použití kitu Sure Clone Ligation Kit (Pharmacia) a liguje se do SmaI restrikčního místa defosforylovaného vektoru PUC18 za použití kitu Sure Clone Ligation Kit (Pharmacia) za získání PUC-hybrid-TcpSE2. Po transformaci E. coli XL1 Blue MRF' kan se provádí minipreparace DNA (Riggs M.G. & McLachlan A., A simplified screening procedure for large number of plasmid mini-preparation. Bio-Techniques 4, str. 310 až 313, 1986) transformantů resistantních k 24 ampicillinu a pozitivní klony se identifikují restrikční analýzou BamHI. Sekvence klónovaného PCR produktu se potvrdí resequencováním za použití kitu ABI PRISM Big Dye Ter-

13.07.02

minator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt).

Plasmid DNA pUC-PSE1 a PUC-hybrid-TcPSE2 se nejdříve štěpí za použití BamHI a získané fragmenty se ligují do BamHI restričního místa defosforylovaného systému kvasinky/E.coli kyvadlového vektoru pYES2 za získání pY2 hybrid-Tc_PSE2.

Po transformaci E. coli a DNA minipreparaci z transformantů se hodnotí orientace DNA fragmentu ve vektoru štěpením s HindIII. Jeden klon se nechá růst za použití extrakčního kitu Nucleobond^R AX 500 plasmid DNA extraction kit (Macherey-Nagel, Düringen) pro DNA maxipreparaci. Saccharomyces INVSc1 se transformuje za použití pY2PSE1, pYES2, pY2-hybrid-Tc_PSE2 a pYES2 za použití modifikovaného PEG/lithiumacetátového protokolu (Ausubel a kol., 1995). Po selekci na Cm^rdum agarových destičkách s obsahem 2 % glukózy se vždy selektují čtyři pY2PSE1 transformanty (pY2PSE1a-d), pY2-hybrid-Tc_PSE2 transformanty (pY2-hybrid-Tc_PSE2 1a-d) a jeden pYES2 transformant pro účely další kultivace a funkční exprese.

Funkční exprese elongázové aktivity v kvasinkách

Předkultura:

Naočkuje se 20 ml kapalného prostředí Cm^rdum se 2 % (hmotnost/objem) rafinózy transgenickými kvasinkovými klony (pY2-hybrid-Tc_PSE2 1a-d, pYES2) a kultivuje se po dobu tří dnů při teplotě 30 °C, za počtu otáček 400/min až do dosažení optické hustoty 600 nm (OD₆₀₀) 1,5 až 2.

Hlavní kultura:

Pro expresi se 20 ml kapalného prostředí Cm^rdum se 2 % rafinózy a 1 % (objem/objem) Tergitolu NP-40 doplní substráty

18.07.02

mastné kyseliny na konečnou koncentraci 0,003% (hmotnost/objem). Prostředí se naočkuje předkulturou OD₆₀₀ 0,05. Expese se navodí na dobu 16 hodin při OD₆₀₀ 0,02 za použití 2 % (hmotnost/objem) galaktózy, načež se kultury sklídí při OD₆₀₀ 0,8 až 1,2.

Analýza mastných kyselin

Veškeré mastné kyseliny se extrahují z kvasinkových kultur a analyzují se plynovou chromatografií. Získají se buňky z 5 ml kultury odstředěním (1000 x g, 10 minut při teplotě 4 °C) a promyjí se jednou 100 mM hydrogenuhličitanem sodným, hodnota pH 8,0, k odstranění zbytkového prostředí a mastných kyselin. Pro přípravu methylesteru mastné kyseliny (FAME) se buněčný sediment zpracovává po dobu jedné hodiny při teplotě 80 °C 1 M methanolovou kyselinou sírovou a 2 % (objem/objem) dimethoxypropanu. FAME se extrahují dvakrát 2 ml petroletheru, promyjí se jednou 100 mM hydrogenuhličitanem sodným, hodnota pH 8,0 a jednou destilovanou vodou a vysuší se síranem sodným. Organické rozpouštědlo se odpaří v proudu argonu a FAME se rozpustí v 50 µl petroletheru. Vzorky se separují na kapilárním sloupci ZEBRON ZB Wax (30 m, 0,32 mm, 0,25 µm; Phenomenex) v plynovém chromatografu Hewlett Packard 6850 vybaveném plamenovým ionizačním detektorem. Teplota v pícce se programuje od 70 °C (na jednu hodinu) až na 200 °C při rychlosti zvyšování teploty o 20 °C za minutu, pak na 250 °C (s prodlevou na této teplotě 5 minut) při rychlosti zvyšování teploty o 5 °C za minutu a konečně na 260 °C při rychlosti zvyšování teploty o 5 °C za minutu. Jako nosičového plynu se používá dusíku (4,5 ml/min při teplotě 70 °C). Mastné kyseliny se identifikují porovnáním s retenční dobou FAME standardů (Sigma).

Vzory mastných kyselin pěti transgenických kvasinkových kmenů jsou uvedeny v mol procentech v tabulce I.

Množství gama-linolenových kyselin, která se přidala a uchopila, jsou zdůrazněna číslicemi vytištěnými výrazně, elongovaných produktů červeně a elongované gama linolenové kyseliny čísla vytištěnými výrazně (poslední řádek).

Na obr. 2a až 2e je GC analýza FAME, přičemž z celkových lipidů kvasinek transformovaných pYES2 (i/kontorla) a pY2PSE1 (ii-iv c+d) v každém případě transformovaných za použití pY2PSE1A, pY2PSE1B, pY2PSE1C, pY2PSE1D). Pro analýzu se transgenické kvasinky kultivují v přítomnosti gama-18:3. V tabulce I jsou jejich vzory mastné kyseliny v mol %. Absorpce gama-18:3 je zdůrazněna číslicemi vytištěnými výrazně, produkt elongace dihomogama-linolenová kyselina (20:3 Δ 8,11,14) je podtržen a množství gama-18:3-elongačního produktu (také v % mol) je zdůrazněno číslicemi vytištěnými výrazně (poslední řádek). Struktura a hmotová spektra DMOX derivátu cis- Δ 6,9,12, C18:3 je na obr. 3a+b. Struktura a hmotová spektra DMOX derivátu 8,11,14 C20:3 je na obr. 4a+b.

Výsledky dokládají, že gama-18:3 byly včleněny do všech transgenických kvasinek ve velkém množství. Všechny čtyři kvasinkové klony, které byly transformované pY2PSE1 mají přídatný pík v plynovém chromatogramu, který se identifikuje jako 20:3 Δ 8,11,14 porovnáním s retenční dobou. Plynová chromatografie/hmotová spektroskopie může poskytovat další důkaz k potvrzení této identity. Procento elongace gama-18:3 je 23,7 až 40,5 %, jak je zřejmé z tabulky I. Kromě toho se nepozoruje žádná výrazná elongace kyseliny palmitové (16:0) palmitolejové (16:1), stearové (18:0) nebo olejové (18:1 9).

Identifikované produkty dokládají, že nukleotidová sekvence PpPSE1 kóduje 6-selektivní elongázu mastné kyseliny z mechu *Physcomitrella patens*, která vede k vytváření nových mastných kyselin v transgenických kvasinkách.

Množství substrátů mastných kyselin, které se adují a uchopují se může stanovit shora uvedenými způsoby, takže kvantita a kvalita elongázové reakce se může zjistit.

Struktura a hmotová spektra DMOX derivátů rovněž dokládají příslušnou pozici dvojně vazby.

Mohou se provádět další krmné pokusy s širokým oborem jiných mastných kyselin (například kyselina arašidonová, eikosa-pentaenová) k podobnému potvrzení substrátové selektivity této elongázy.

Příklad 18

Izolace žádaného produktu z transformovaných organismů obecně

Žádané produkty se získají z rostlinného materiálu nebo z organismů jako jsou houby, řasy, ciliates, živočišné buňky nebo ze supernatantu shora popsaných kultur různými způsoby známými ze stavu techniky. Pokud se žádaný produkt nesekretuje z buněk, mohou se buňky sklízet z kultur pomalým odstředováním a buňky se mohou lyzovat o sobě známými způsoby například mechanickou silou nebo sonizací. Rostlinné orgány se mohou oddělovat mechanicky z jiných tkání nebo z jiných orgánů. Po homogenizaci se buněčné zbytky vyjmou z odstředivky a supernatantová frakce, která obsahuje rozpustné proteiny, se ponechá pro další izolaci žádané sloučeniny. Pokud je produkt sekretován z žádaných buněk, odstraní se buňky z kultury pomalým odstředováním, supernatantová frakce se ponechá pro další izolaci.

Supernatantová frakce z každého izolačního stupně se podrobuje chromatografii se vhodnou pryskyřicí, žádaná molekula se buď zadržuje na chromatografické pryskyřici, přičemž četné nečistoty ve vzorku nejsou nebo nečistoty zůstávají na prysky-

řici a ve vzorku nikoliv. Tyto chromatografické stupně se mohou opakovat popřípadě za použití těchto nebo jiných chromatografických pryskyřic. Pracovník v oboru umí volit vhodné chromatografické pryskyřice s jejich nejúčinnější použitím pro izolaci určité molekuly. Izolovaný produkt se může koncentrovat filtrací nebo ultrafiltrací a ukládat při teplotě, při které je stabilita produktu nejvyšší.

Široké spektrum izolačních způsobů je v oboru známo a není záměrem shora uvedené izolační způsoby chápat jako omezení. Tyto izolační způsoby jsou popsány v literatuře (naříklad Bailey J.E. & Ollis D.F., *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill: New York, 1986).

Identita a čistota izolovaných sloučenin se mohou stanovit v oboru o sobě známými způsoby. Zahrnují vysoko výkonnou kapalinou chromatografii (HPLC), spektroskopické způsoby, zabarvovací způsoby, chromatografii v tenké vrstvě, NIRS, enzymové testy nebo mikrobiologické způsoby. Přehledně jsou tyto způsoby popsány v literatuře (Patek a kol., *Appl Environ. Microbiol.* 60, str. 133 až 140, 1994; Malakhova a kol., *Biotechnologiya* 11, str. 27 až 32, 1996; a Schmidt a kol., *Bioprocess Engineer.* 19 str. 67 až 70, 1998; *Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, svazek A27, VCH Weinheim, str. 89 až 90, str. 521 až 540, str. 540 až 547, str. 559 až 566, str. 575 až 581 a str. 581 až 587, 1996; Michal G., *Biochemical Pathway: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*, John Wiley & Sons, 1999; Fallon A. a kol., *Application of HPLC in Biochemistry, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, svazek 17, 1987).

Ekvivalenty

Pracovníkům v oboru je známo, že jsou možné četné ekvivalenty specifických provedení podle vynálezu, které jsou zde

18.07.00

popsány v rámci jednoduchých rutinních zkoušek. Tyto ekvivalenty vynález zahrnuje.

Průmyslová využitelnost

Způsobu přípravy polynenasycených mastných kyselin a způsoby zavádění DNA do organismů, které produkují velké množství olejů, zvláště olejů s vysokým obsahem nenasycených mastných kyselin. Zvláště příprava oleje a/nebo mastné kyseliny s vyšším obsahem polynenasycených mastných kyselin s alespoň dvěma dvojnými vazbami a/nebo přípravy triacylglycerolu s vysokým obsahem polynenasycených mastných kyselin s alespoň dvěma dvojnými vazbami.



JUDr. Petr Kalenský
advokát

SPOLEČNÁ ADVOKÁTNÍ KANCELÁŘ
VSETEČKA ZELENÝ ŠVORČÍK KALENSKÝ
A PARTNEŘI
120 00 Praha 2, Hájkova 2
Česká republika

18.07.02

IV 2002-402

13934

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Izolovaná nukleová kyselina odvozená z rostlin nebo z řas a kódující polypeptid, která elonguje mastné kyseliny se 16, s 18 nebo se 20 atomy uhlíku s alespoň se dvěma dvojnými vazbami ve skeletu mastné kyseliny o alespoň dva atomy uhlíku.

2. Izolovaná nukleová kyselina zahrnující nukleotidovou sekvenci kódující polypeptid, který elonguje mastné kyseliny se 16, s 18 nebo se 20 atomy uhlíku s alespoň se dvěma dvojnými vazbami v molekule mastné kyseliny, vybraný ze souboru zahrnujícího

- a) sekvenci nukleové kyseliny uvedené v SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7,
- b) sekvenci nukleové kyseliny, která podle degenerace genetického kódu je odvozena z jedné sekvence uvedené v SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7,
- c) deriváty sekvencí uvedené v SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, které kódují polypeptidy sekvence aminokyseliny uvedené v SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 nebo SEQ ID NO:8, a které mají alespoň 50% homologii se zřetelem na aminokyselinu bez podstatného snížení enzymatické aktivity polypeptidů.

3. Izolovaná sekvence nukleové kyseliny podle nároku 2, odvozená z rostliny, řasy nebo houby.

4. Izolovaná sekvence nukleové kyseliny podle nároku 2 nebo 3 odvozená od organismu *Physcomitrella*, *Thraustochytrium* nebo *Crypthecodinium*.

5. Genový konstrukt zahrnující izolovanou nukleovou kyselinu podle nároku 1 až 4, která je funkčně vázána na jeden nebo na několik regulačních signálů.

6. Genový konstrukt podle nároku 5, jehož genová exprese je podporována regulačními signály.
7. Genový konstrukt obsahující sekvenci nukleové kyseliny podle nároku 1 až 4 nebo genový konstrukt podle nároku 5 nebo 6 a alespoň jednu další nukleovou kyselinu, která kóduje gen biosyntézy mastné kyseliny.
8. Genový konstrukt podle nároku 7, přičemž nukleová kyselina, která kóduje gen biosyntézy mastné kyseliny, je volena ze souboru zahrnujícího $\Delta 19$ -, $\Delta 17$ -, $\Delta 15$ -, $\Delta 12$ -, $\Delta 9$ -, $\Delta 8$ -, $\Delta 6$ -, $\Delta 5$ -, $\Delta 4$ -desaturázu, různé hydroxylázy, $\Delta 12$ -acetylenázu, acyl-ACP thioesterázy, β -ketoacyl-ACPsyntázy nebo β -ketoacyl-ACP reduktázy.
9. Aminokyselinová sekvence, která je kódována izolovanou aminokyselinovou sekvencí podle nároku 1 až 4 nebo genovým konstruktem podle nároku 5 až 8.
10. Vektor zahrnující nukleovou kyselinu podle nároku 1 až 4 nebo genový konstrukt podle nároku 5 až 8.
11. Organismus zahrnující nukleovou kyselinu podle nároku 1 až 4 nebo genový konstrukt podle nároku 5 až 8 nebo vektor podle nároku 10.
12. Organismus podle nároku 11, kterým je mikroorganismus, živočich nebo rostlina.
13. Organismus podle nároku 11 nebo 12, kterým je transgenická rostlina.
14. Protilátka, která specificky váže polypeptid, který se kóduje jednou z nukleových kyselin podle nároku 1 až 4.

15. Antismyslová molekula nukleové kyseliny, která zahrnuje komplementární sekvenci nukleové kyseliny podle nároku 1 až 4.

16. Způsob přípravy polynenasycené mastné kyseliny, vyznačující se tím, že se kultivuje organismus, který zahrnuje nukleovou kyselinu podle nároku 1, genový konstrukt podle nároku 6 nebo vektor podle nároku 10, kódující polypeptid, který elonguje mastné kyseliny se 16, s 18 nebo se 20 atomy uhlíku alespoň se dvěma dvojnými vazbami v molekule mastné kyseliny o alespoň dva atomy uhlíku za podmínek, při kterých se polynenasycené mastné kyseliny vytvářejí v organismu.

17. Způsob podle nároku 16, vyznačující se tím, že polynenasycenými mastnými kyselinami jsou molekuly mastné kyseliny se 16, s 18 nebo se 20 atomy uhlíku alespoň se dvěma dvojnými vazbami v molekule mastné kyseliny.

18. Způsob podle nároku 16 nebo 17, vyznačující se tím, že se molekuly mastné kyseliny s 18, se 20 nebo se 22 atomy uhlíku izolují z organismu ve formě oleje, lipidu nebo volné mastné kyseliny.

19. Způsob podle nároku 16 až 18, vyznačující se tím, že organismem je mikroorganismus, živočich nebo rostlina.

20. Způsob podle nároku 16 až 19, vyznačující se tím, že organismem je transgenická rostlina.

21. Způsob podle nároku 16 až 20, vyznačující se tím, že mastnou kyselinou se 16, s 18 nebo se 20 atomy uhlíku je mastná kyselina se třemi dvojnými vazbami v molekule.

22. Olej, lipid nebo mastná kyselina nebo její frakce připravené způsobem podle nároku 16 až 21.

23. Kompozice oleje, lipidu nebo mastné kyseliny obsahující polynenasycené mastné kyseliny odvozené od transgenické rostliny.

24. Kompozice oleje, lipidu nebo mastné kyseliny podle nároku 23, přičemž polynenasycené mastné kyseliny jsou odvozeny od transgenických rostlin, které obsahují nukleotidovou sekvenci podle nároku 1 až 4, genový konstrukt podle nároku 5 až 8, antismyslovou molekula nukleové kyseliny podle nároku 15 nebo vektor podle nároku 10.

25. Použití kompozice oleje, lipidu nebo mastné kyseliny podle nároku 22 až 24 v krmivech, v potravinách, v kosmetických nebo ve farmaceutických prostředcích.

26. Kompozice obsahující protilátku podle nároku 14, konstrukt antismyslové molekuly nukleové kyseliny podle nároku 15 nebo antagonist nebo agonist podle nároku 28.

27. Kit, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje nukleovou kyselinu podle nároku 1 až 4, genový konstrukt podle nároku 5 až 8, antismyslovou molekula nukleové kyseliny podle nároku 15, protilátku podle nároku 14, antagonist nebo agonist podle nároku 28, kompozuici podle nároku 26, aminokyselinovou sekvenci podle nároku 9 a/nebo olej, lipidy a/nebo mastné kyseliny nebo jejich frakci podle nároku 22 až 25.

28. Způsob pro identifikaci agonistu nebo antagonistu elongáz, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se
a) uvádějí se do styku buňky, které expresují polypeptid podle vynálezu, s kandidátskou substancí,

18.07.00

b) testuje se PSE aktivita,

c) porovnává se PSE aktivita se standardní aktivitou v nepřítomnosti kandidátské substance, přičemž PSE aktivita, která je vyšší než standard, naznačuje, že kandidátská substance je agonistem a přičemž PSE aktivita, která je nižší než standard, naznačuje, že kandidátská substance je antagonistem.

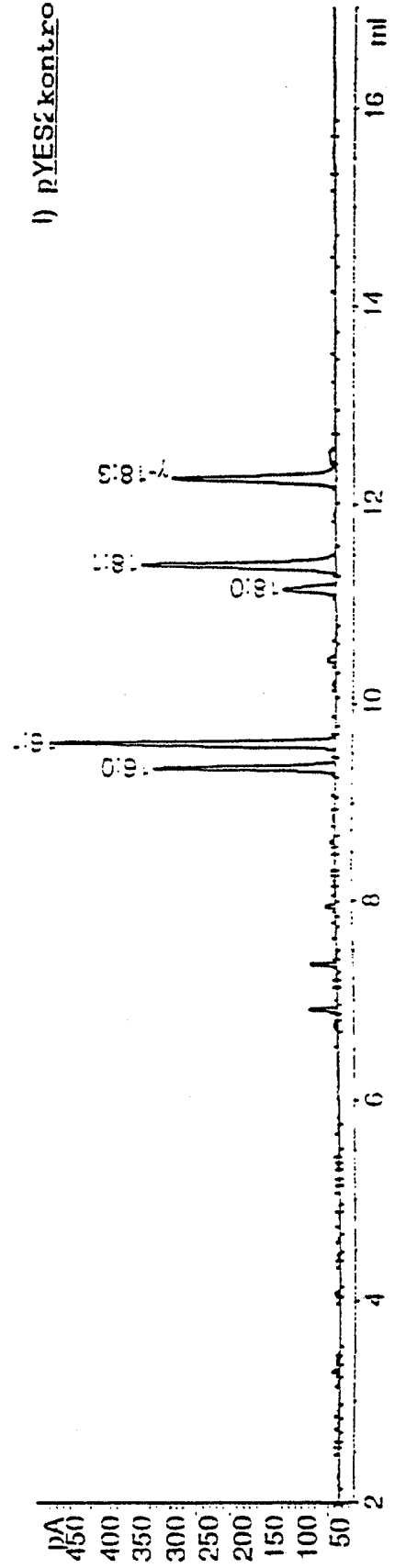
SPOLEČNÁ ADVOKÁTNÍ KANCELÁŘ
VŠETEČKA ZELENÝ ŠVORČÍK KALENSKÝ
A PARTNEŘI

120 00 Praha 2, Hájkova 2
Česká republika


JUDr. Petr Kalenský
advokát

OBR. 2a

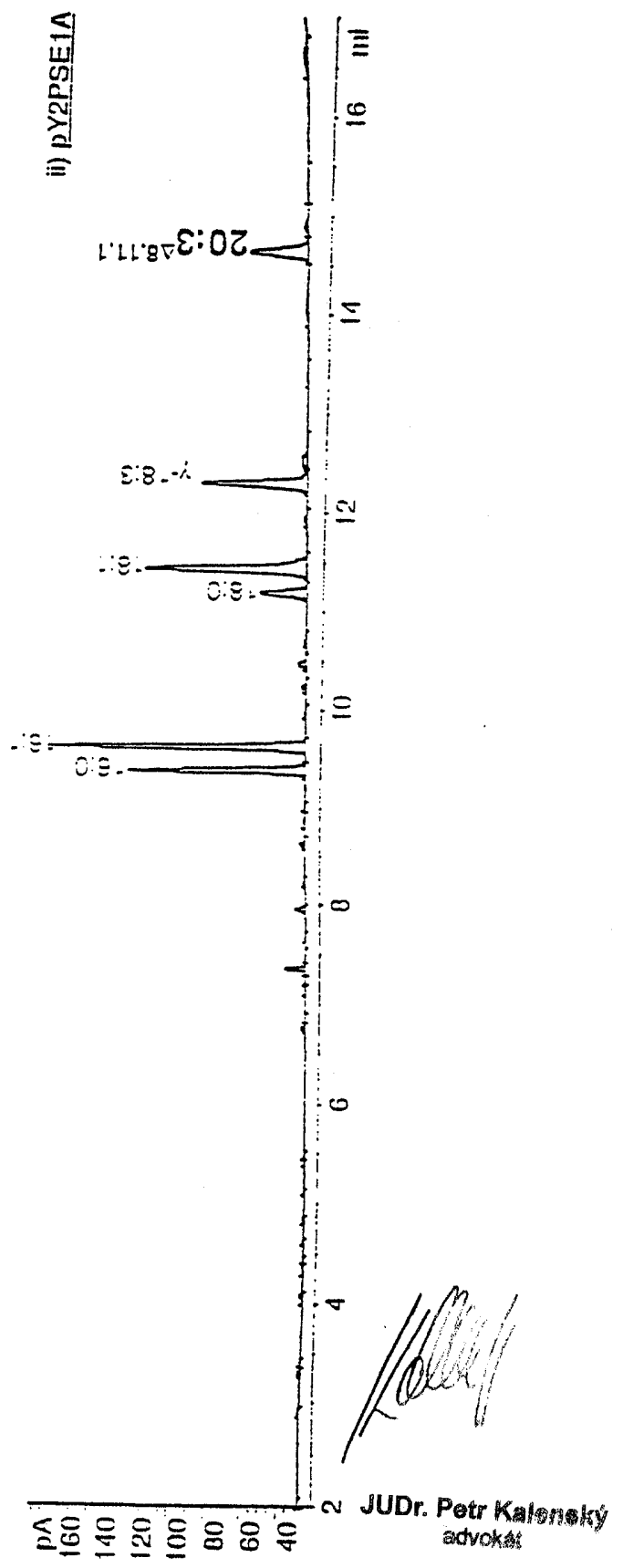
1) pYES2 kontrola



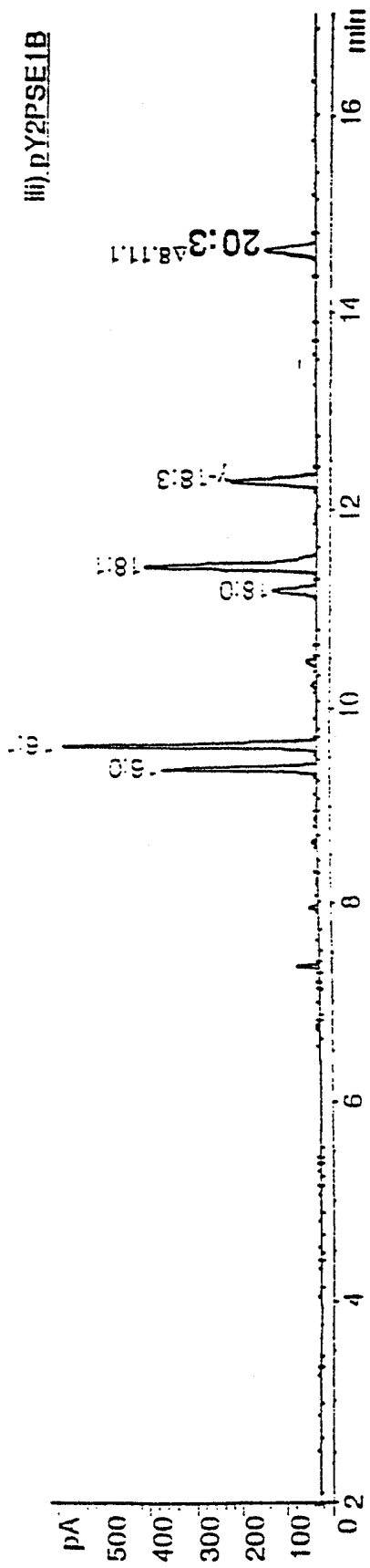
JUDr. Petr Kalinický
advokát

18.07.00

OBR. 2h

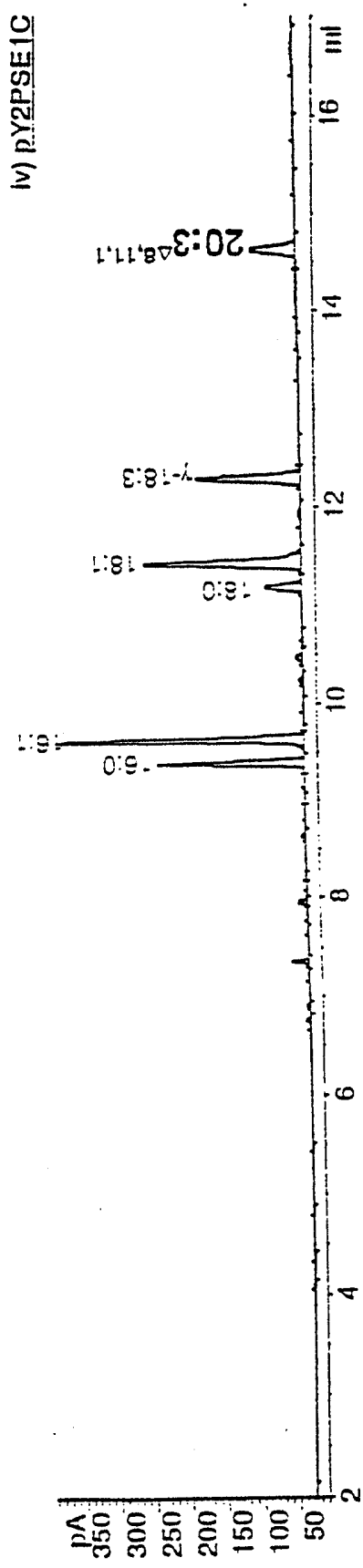


OBR - 2c



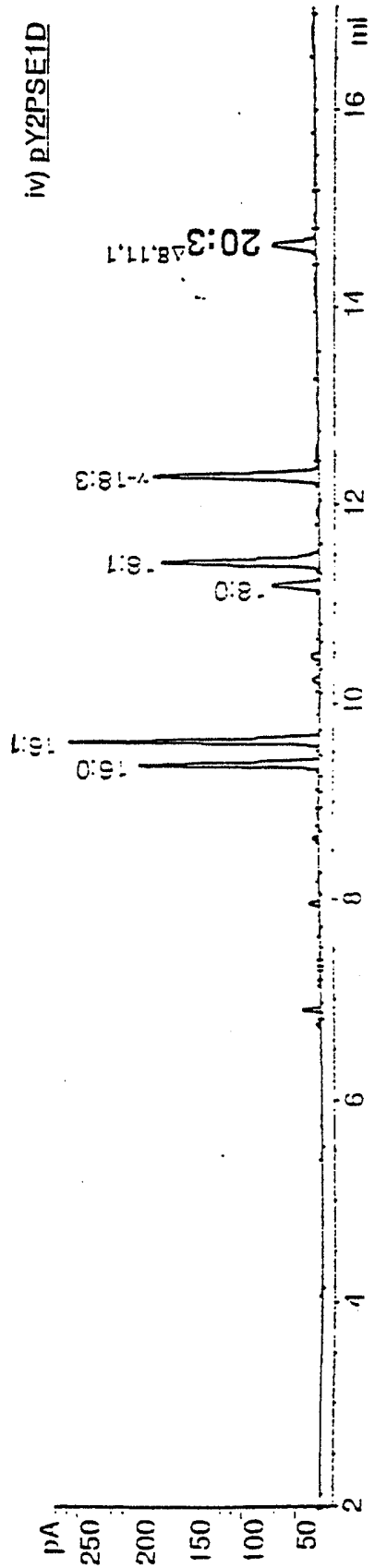
JUDr. Petr Kalenský
advokát

OBR. 2d



JUDr. Petr Kalenický
advokát

OBR - 2c



JUDr. Petr Kalenský
advokát

OBR. 3a: DMOX derivative of cis $\Delta^{6,9,12}$ 18:3

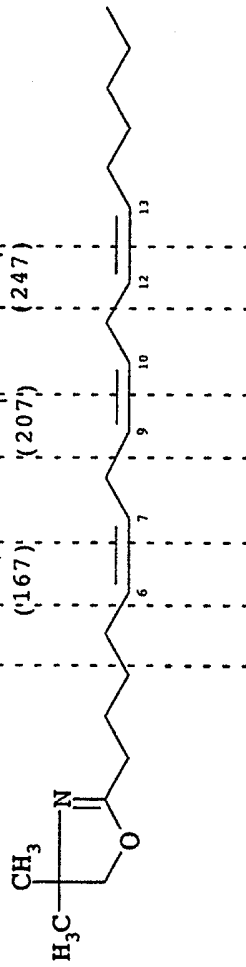
EI-MS DMOX derivátu

cis $\Delta^{6,9,12}$ 18:3

$\Delta m/z=12$ $\Delta m/z=12$ $\Delta m/z=12$

140 154, 166 194 206 234 246

(167) (207) (247)



JUDr. Petr Kalenský
advokát

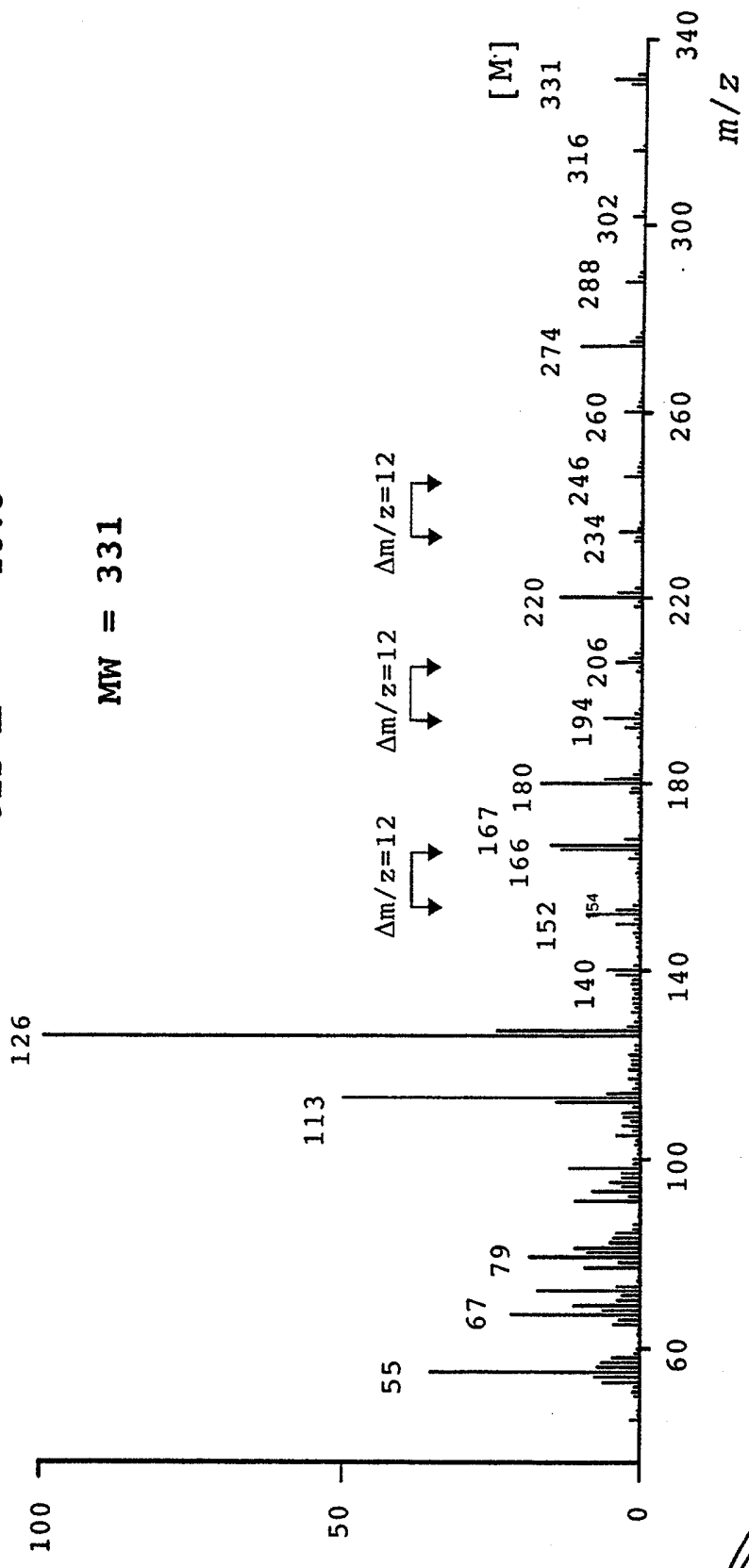
0000

OBR. 3b:

EI-MS DMOX derivátu
cis $\Delta_{6,9,12}$ 18:3

MW = 331

relativní
intenzita

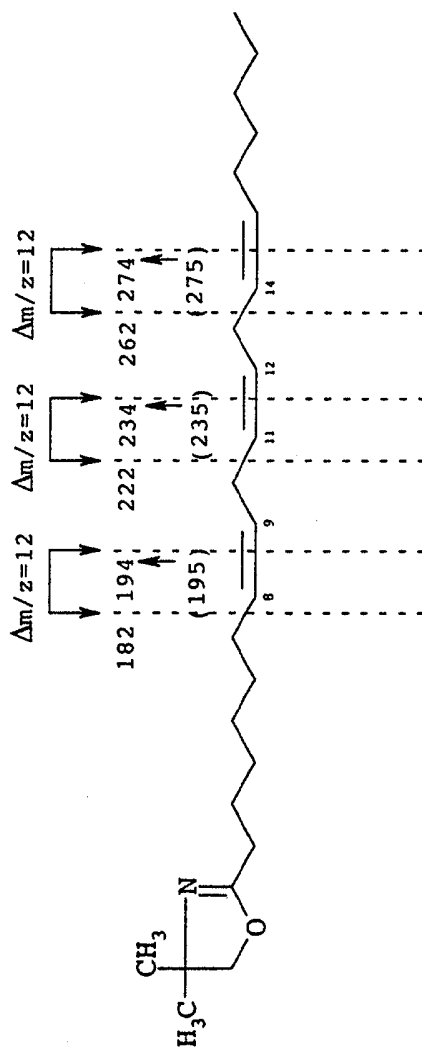


JUDr. Petr Katsenky
advokát

OBR. 4a:

EI-MS DMOX derivátu

cis $\Delta^{8,11,14}$ 20:3



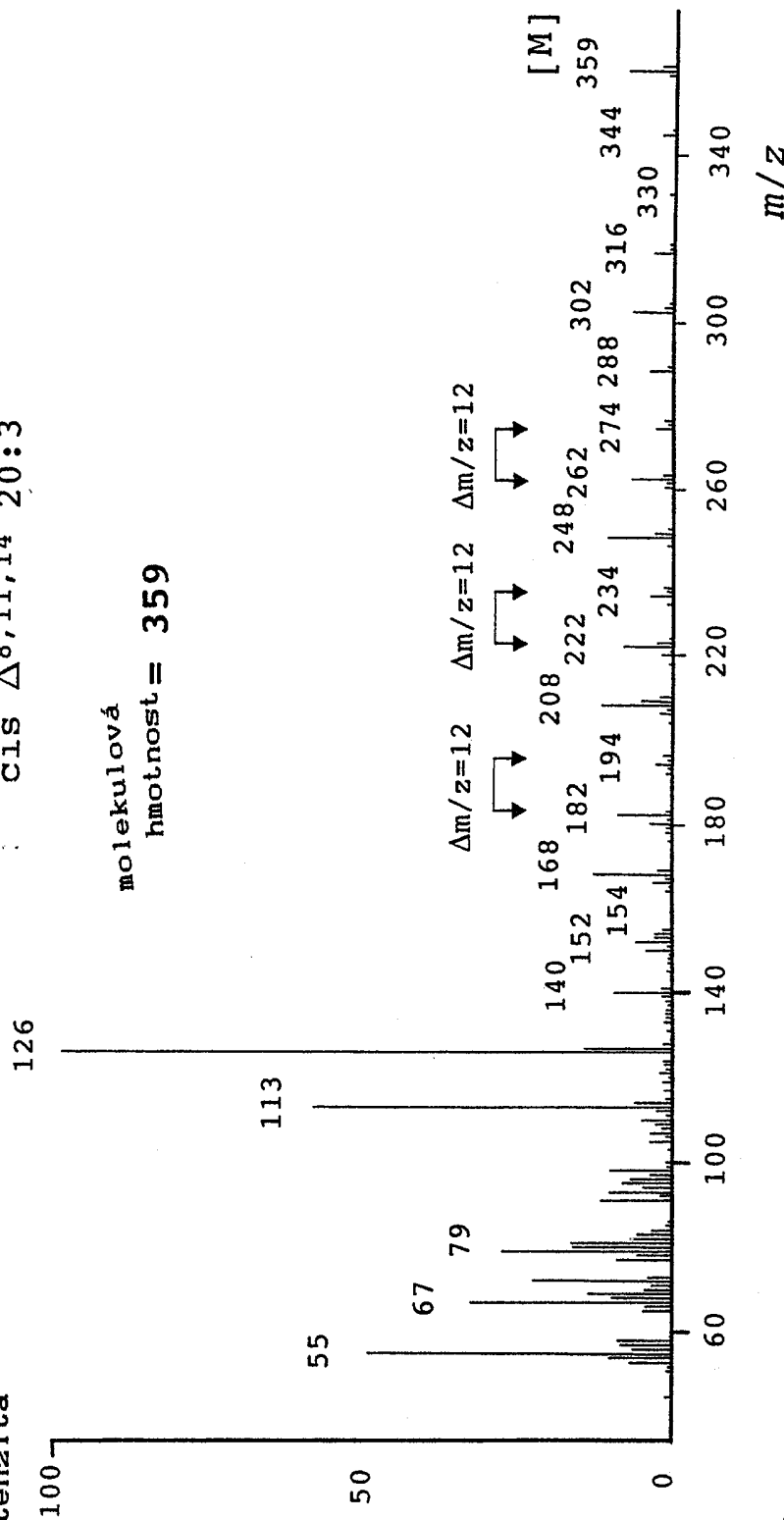
JUDr. Petr Kalnský
advokát



OBR. 4b:

relativní
intenzita

EI-MS DMOX derivátu
cis Δ^{8,11,14} 20:3




 JUDr. Petr Kalenský
 advokát

OBR. 5:

Pp_PSE1: KHKEMAILVYLFYMSKYVEFMDTVIMILKRSTQISFLHVYHHSSISLIWVAIAHHPGCG

KH ++ LF +SK E+ DTV++I+K + ++ FLHV HH++ W H

Tc_PSE1: KHPHFQLISLLFALSKIWEWFDVLLLVKGN---KLRFLHVLHHATT--FWLYAIDHIFLS

Pp_PSE1: EAYWSAALNSGVHVLMYAYYFLAACLRSSPKLNKYLFWGRYLTQFQMFQFMLNL-----

+ A+N+ +H +MYA+YF R PK + TQ Q+ QF+ ++

Tc_PSE1: SIKYGVAVNAFIHTVMYAHYF-----RPFPGKLRPLI-----TQLQIVQFIFSIGIHTA

Pp_PSE1: VQAYYDMKTNAPYPQWLKILFYMYMISLLFLFGNFYVQKYI

+ +YD + W + +++ L LF NFY+Q+Y+

Tc_PSE1: IYWHYDCEPLVHTHFWEYVTPYLFVVVFFLILFLNFYLOQYV

JUDr. Petr Kalenský
advokát

OBR. 6:

PP_PSE1: LNSGVHLMYAYFLAA
+N+VH +MYAY A
TC_PSE2: INASVHAIMYAYAFTA



JUDr. Petr Kalenský
advokát

OBR. 7:

Pp_PSE1: AILVYLFYMSKYVEFMDTVIMILKRSTRQISFLHVYHHSSISLIWW-AIA-HHAPGGEAY
 A+ + LF SK E MDTV +ILK +++ FL YHH+++ L W A+A + PG
 Cc_PSE1: ALALCLFCFSKIPELMDTVFLILKG--KKVRFLOWYHHATVMLFCWLALATEYTPG---L

Pp_PSE1: WSAALNSGVHVLMYAYFL 203
 W AA N VH +MY Y+FL
 Cc_PSE1: WFAATNFVHSIMYMYFFL 339


 JUDr. Petr Kalenský
 advokát

OBR. 8 Alignment of the polypeptide sequence PpPSE1 and Tc_PSE2

Pp_PSE1: 1 MEVVERFYGELDGKVSQGVNAL.LGSFGVELTDTPTTKGLPLVDSPTPIV 49
 | |.. | . | . || . |
 Tc_PSE2: 1VISGLDLLPVLSWETMKFDTAEVVSVWLRTHMWVVF 36

50 LGVSVYLTIVIGLLWIKAR...DL.KPRASEPFLQALVLVHNLFCEAL 95
 | :|| :: | :.. | || || | . | . : :
 37 LMCFIYLVVIFGIQYYMEDRKEFDLRKPLAA....WSAFLAIFSIGASIR 82

96 SLYMCVGIAYQAITWRYS LWGNAYNP..KHKEMAILVYLFYMSKYVEFMD 143
 | : | : | | . | : | || | . |
 83 TVPVLLKMLYEKGT.HHVLCGDTRNDWVIDNPAGVWTMAFIFSKIPELID 131

144 TVIMILKRSTRQISFLHVYHHSSISLI.WWAI AHHPGGEAYWSAALNSG 192
 | . . : | : : | . : || || | . : | | | | | | : || : | .
 132 TLFIVLRK..RKLITLHWYHHVTVLLFCWHAWATFALTGIVF..AAINAS 177

193 VHVLMYAYYFLAACLRSSPKLKNKYLFWGRYLTQFQMFQFMLNLVQAY.. 240
 || : || || | | | | | : | | . | .. :
 178 VHAIMYAYYAFTA.LGYRP...TSYAI...YITLIQIMQMVVGTAVTFYI 220

241 .YDMKTNAPYP.....QW..LIK.....ILFYMI...S 263
 || | | | | | : | .. |
 221 GYDMAFVTPQPFRLDMKLNWDPLSKGENTEPTCKGANSSNAIFGVIMYAS 270

264 LLFLFGNFYVQKYIKPSDGKQKGAKE. 290
 | : || | : | : : | ||
 271 YLYLFCLEFFYMAYLRPKKSTPAAKKN. 297

| identická aminokyselina
./: chemický ekvivalent

JUDr. Petr Kalenský
advokát

OBR. 10

	Motif 1	Motif 2	Motif 3	Motif 4
Pp_PSE1		FLHVVYHH	LMYAYYF	FGNIFYVQ
Tc_PSE1		FLHVLHH	LMYAHYF	FLNIFYLQ
Tc_PSE2	FSKIPEL	TLHWYHH	IMYAYFF	
Cc_PSE1	FSKIPEL	FLQWYHH	IMYMYFF	

konsenzus:	FSKIPEL	FLHWYHH	LMYAYYF	FGNIFYVQ
variac:		T QVL	I MHF	L L



JUDr. Petr Kalenský
advokát

18.07.02

SEZNAM SEKVENCÍ

PV 2002-2012

13934

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> Elongázový gen a způsob přípravy polynenasycených
mastných kyselin

<130> 0050/51159

<140> 20000081

<141> 2000-02-09

<160> 12

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 1192

<212> DNA

<213> Physcomitrella patens

<220>

<221> CDS

<222> (58)..(930)

<400> 1

ctgcttcgtc tcaccttggg ggtgtgattc gggagtgggt tgagttggtg gagcgca 57

atg gag gtc gtg gag aga ttc tac ggt gag ttg gat ggg aag gtc tcg 105
Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu Leu Asp Gly Lys Val Ser
1 5 10 15

cag ggc gtg aat gca ttg ctg ggt agt ttt ggg gtg gag ttg acg gat 153
Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe Gly Val Glu Leu Thr Asp
20 25 30

acg ccc act acc aaa ggc ttg ccc ctc gtt gac agt ccc aca ccc atc 201
Thr Pro Thr Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val Asp Ser Pro Thr Pro Ile
35 40 45

gtc ctc ggt gtt tct gta tac ttg act att gtc att gga ggg ctt ttg 249
Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile Val Ile Gly Gly Leu Leu
50 55 60

tgg ata aag gcc agg gat ctg aaa ccg cgc gcc tcg gag cca ttt ttg 297
Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg Ala Ser Glu Pro Phe Leu
65 70 75 80

ctc	caa	gct	ttg	gtg	ctt	gtg	cac	aac	ctg	ttc	tgt	ttt	gcg	ctc	agt	345
Leu	Gln	Ala	Leu	Val	Leu	Val	His	Asn	Leu	Phe	Cys	Phe	Ala	Leu	Ser	
			85					90						95		
ctg	tat	atg	tgc	gtg	ggc	atc	gct	tat	cag	gct	att	acc	tgg	cgg	tac	393
Leu	Tyr	Met	Cys	Val	Gly	Ile	Ala	Tyr	Gln	Ala	Ile	Thr	Trp	Arg	Tyr	
			100					105						110		
tct	ctc	tgg	ggc	aat	gca	tac	aat	cct	aaa	cat	aaa	gag	atg	gcg	att	441
Ser	Leu	Trp	Gly	Asn	Ala	Tyr	Asn	Pro	Lys	His	Lys	Glu	Met	Ala	Ile	
			115					120						125		
ctg	gta	tac	ttg	ttc	tac	atg	tct	aag	tac	gtg	gaa	ttc	atg	gat	acc	489
Leu	Val	Tyr	Leu	Phe	Tyr	Met	Ser	Lys	Tyr	Val	Glu	Phe	Met	Asp	Thr	
			130					135						140		
gtt	atc	atg	ata	ctg	aag	cgc	agc	acc	agg	caa	ata	agc	ttc	ctc	cac	537
Val	Ile	Met	Ile	Leu	Lys	Arg	Ser	Thr	Arg	Gln	Ile	Ser	Phe	Leu	His	
						150								160		
gtt	tat	cat	cat	tct	tca	att	tcc	ctc	att	tgg	tgg	gct	att	gct	cat	585
Val	Tyr	His	His	Ser	Ser	Ile	Ser	Leu	Ile	Trp	Trp	Ala	Ile	Ala	His	
						165								170		
cac	gct	cct	ggc	ggt	gaa	gca	tat	tgg	tct	gcg	gct	ctg	aac	tca	gga	633
His	Ala	Pro	Gly	Gly	Glu	Ala	Tyr	Trp	Ser	Ala	Ala	Leu	Asn	Ser	Gly	
			180											190		
gtg	cat	gtt	ctc	atg	tat	gcg	tat	tac	ttc	ttg	gct	gcc	tgc	ctt	cga	681
Val	His	Val	Leu	Met	Tyr	Ala	Tyr	Tyr	Phe	Leu	Ala	Ala	Cys	Leu	Arg	
			195											200		
agt	agc	cca	aag	tta	aaa	aat	aag	tac	ctt	ttt	tgg	ggc	agg	tac	ttg	729
Ser	Ser	Pro	Lys	Leu	Lys	Asn	Lys	Tyr	Leu	Phe	Trp	Gly	Arg	Tyr	Leu	
			210											220		
aca	caa	ttc	caa	atg	ttc	cag	ttt	atg	ctg	aac	tta	gtg	cag	gct	tac	777
Thr	Gln	Phe	Gln	Met	Phe	Gln	Phe	Met	Leu	Asn	Leu	Val	Gln	Ala	Tyr	
														230		
tac	gac	atg	aaa	acg	aat	gcg	cca	tat	cca	caa	tgg	ctg	atc	aag	att	825
Tyr	Asp	Met	Lys	Thr	Asn	Ala	Pro	Tyr	Pro	Gln	Trp	Leu	Ile	Lys	Ile	
														245		
ttg	ttc	tac	tac	atg	atc	tcg	ttg	ctg	ttt	ctt	ttc	ggc	aat	ttt	tac	873
Leu	Phe	Tyr	Tyr	Met	Ile	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Phe	Gly	Asn	Phe	Tyr	
														260		
														265		
																270

190702

gta caa aaa tac atc aaa ccc tct gac gga aag caa aag gga gct aaa 921
Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ala Lys
275 280 285

act gag tga gctgtatcaa gccatagaaa ctctattatg ttagaacctg 970
Thr Glu
290

aagttggtgc tttcttatct ccacttatct tttaagcagc atcagttttg aatgatgtg 1030

tgggcgtggt ctgcaagtag tcatcaatat aatcggcctg agcacttcag atggattggt 1090

agaacatgag taaaagcggg tattacgggtg tttattttgt accaaatcac cgcacgggtg 1150

aattgaaata tttcagattt gatcaatttc atctgaaaaa aa 1192

<210> 2

<211> 290

<212> PRT

<213> *Physcomitrella patens*

<400> 2

Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu Leu Asp Gly Lys Val Ser
1 5 10 15

Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe Gly Val Glu Leu Thr Asp
20 25 30

Thr Pro Thr Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val Asp Ser Pro Thr Pro Ile
35 40 45

Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile Val Ile Gly Gly Leu Leu
50 55 60

Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg Ala Ser Glu Pro Phe Leu
65 70 75 80

Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu Phe Cys Phe Ala Leu Ser
85 90 95

Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln Ala Ile Thr Trp Arg Tyr
100 105 110

Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys His Lys Glu Met Ala Ile
115 120 125

Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr Val Glu Phe Met Asp Thr

Ile Tyr Thr Ser Tyr Leu Met Ile Gln Asp Gly His Phe Arg Ser Leu
 20 25 30

gag gcg gca acg tgc gag ccg ctc aag cat ccg cac ttc cag ctc atc 144
 Glu Ala Ala Thr Cys Glu Pro Leu Lys His Pro His Phe Gln Leu Ile
 35 40 45

agc ttg ctc ttt gcg ctg tcc aag atc tgg gag tgg ttc gac acg gtg 192
 Ser Leu Leu Phe Ala Leu Ser Lys Ile Trp Glu Trp Phe Asp Thr Val
 50 55 60

ctc ctc atc gtc aag ggc aac aag ctc cgc ttc ctg cac gtc ttg cac 240
 Leu Leu Ile Val Lys Gly Asn Lys Leu Arg Phe Leu His Val Leu His
 65 70 75 80

cac gcc acg acc ttt tgg ctc tac gcc atc gac cac atc ttt ctc tcg 288
 His Ala Thr Thr Phe Trp Leu Tyr Ala Ile Asp His Ile Phe Leu Ser
 85 90 95

tcc atc aag tac ggc gtc gcg gtc aat gct ttc atc cac acc gtc atg 336
 Ser Ile Lys Tyr Gly Val Ala Val Asn Ala Phe Ile His Thr Val Met
 100 105 110

tac gcg cac tac ttc cgc cca ttc ccg aag ggc ttg cgc ccg ctt att 384
 Tyr Ala His Tyr Phe Arg Pro Phe Pro Lys Gly Leu Arg Pro Leu Ile
 115 120 125

acg cag ttg cag atc gtc cag ttc atc ttc agc atc ggc atc cat acc 432
 Thr Gln Leu Gln Ile Val Gln Phe Ile Phe Ser Ile Gly Ile His Thr
 130 135 140

gcc atc tac tgg cac tac gac tgc gag ccg ctc gtg cat acc cac ttt 480
 Ala Ile Tyr Trp His Tyr Asp Cys Glu Pro Leu Val His Thr His Phe
 145 150 155 160

tgg gaa tac gtc acg ccc tac ctc ttc gtc gtg ccc ttc ctc atc ctc 528
 Trp Glu Tyr Val Thr Pro Tyr Leu Phe Val Val Pro Phe Leu Ile Leu
 165 170 175

ttt ctc aat ttc tac ctg cag cag tac gtc ctc gcg ccc gca aaa acc 576
 Phe Leu Asn Phe Tyr Leu Gln Gln Tyr Val Leu Ala Pro Ala Lys Thr
 180 185 190

aag aag gca tag ccacgtaaca gtagaccagc agcgccgagg acgcgtgccg 628
 Lys Lys Ala
 195

cgttatcgcg aagcacgaaa taaagaagat catttgattc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 687

<210> 4
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> Thraustochytrium

<400> 4

Arg Ser Val His Asn Leu Gly Leu Cys Leu Phe Ser Gly Ala Val Trp
 1 5 10 15

Ile Tyr Thr Ser Tyr Leu Met Ile Gln Asp Gly His Phe Arg Ser Leu
 20 25 30

Glu Ala Ala Thr Cys Glu Pro Leu Lys His Pro His Phe Gln Leu Ile
 35 40 45

Ser Leu Leu Phe Ala Leu Ser Lys Ile Trp Glu Trp Phe Asp Thr Val
 50 55 60

Leu Leu Ile Val Lys Gly Asn Lys Leu Arg Phe Leu His Val Leu His
 65 70 75 80

His Ala Thr Thr Phe Trp Leu Tyr Ala Ile Asp His Ile Phe Leu Ser
 85 90 95

Ser Ile Lys Tyr Gly Val Ala Val Asn Ala Phe Ile His Thr Val Met
 100 105 110

Tyr Ala His Tyr Phe Arg Pro Phe Pro Lys Gly Leu Arg Pro Leu Ile
 115 120 125

Thr Gln Leu Gln Ile Val Gln Phe Ile Phe Ser Ile Gly Ile His Thr
 130 135 140

Ala Ile Tyr Trp His Tyr Asp Cys Glu Pro Leu Val His Thr His Phe
 145 150 155 160

Trp Glu Tyr Val Thr Pro Tyr Leu Phe Val Val Pro Phe Leu Ile Leu
 165 170 175

Phe Leu Asn Phe Tyr Leu Gln Gln Tyr Val Leu Ala Pro Ala Lys Thr
 180 185 190

Lys Lys Ala
 195

<210> 5
 <211> 955
 <212> DNA
 <213> *Thaustochytrium*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(894)

<400> 5

gtc att tcg ggc ctc gac ctt ctc ccc gtg ctc tcg tgg gag act atg 48
 Val Ile Ser Gly Leu Asp Leu Leu Pro Val Leu Ser Trp Glu Thr Met
 1 5 10 15

aag ttc gac act gcc gaa gtt gtc tcg gtc tgg ctg cgc acg cac atg 96
 Lys Phe Asp Thr Ala Glu Val Val Ser Val Trp Leu Arg Thr His Met
 20 25 30

tgg gtc ccc ttc ctg atg tgc ttc atc tac ctg gtc gtc atc ttc ggc 144
 Trp Val Pro Phe Leu Met Cys Phe Ile Tyr Leu Val Val Ile Phe Gly
 35 40 45

atc cag tac tac atg gag gac cgc aag gag ttc gat ctg cgc aag ccg 192
 Ile Gln Tyr Tyr Met Glu Asp Arg Lys Glu Phe Asp Leu Arg Lys Pro
 50 55 60

ctg gcc gcc tgg agc gcc ttc ttg gcc att ttc agc atc ggc gcc tcc 240
 Leu Ala Ala Trp Ser Ala Phe Leu Ala Ile Phe Ser Ile Gly Ala Ser
 65 70 75 80

atc cgc acc gtg ccc gtc ctg ctc aag atg ctc tac gaa aag ggc acg 288
 Ile Arg Thr Val Pro Val Leu Leu Lys Met Leu Tyr Glu Lys Gly Thr
 85 90 95

cac cac gtg ctc tgc ggc gac acg cgc aac gac tgg gtc att gac aac 336
 His His Val Leu Cys Gly Asp Thr Arg Asn Asp Trp Val Ile Asp Asn
 100 105 110

ccg gcc ggc gtc tgg acc atg gcc ttt atc ttt tcc aag att ccc gag 384
 Pro Ala Gly Val Trp Thr Met Ala Phe Ile Phe Ser Lys Ile Pro Glu
 115 120 125

ctc atc gac acc ctc ttt atc gtg ctc cgc aag cgc aag ctc atc acc 432
 Leu Ile Asp Thr Leu Phe Ile Val Leu Arg Lys Arg Lys Leu Ile Thr
 130 135 140

ctc cac tgg tac cac cac gtg acc gtg ctc ctg ttc tgc tgg cac gcc 480
 Leu His Trp Tyr His His Val Thr Val Leu Leu Phe Cys Trp His Ala

260

265

270

Tyr Leu Phe Cys Leu Phe Phe Tyr Met Ala Tyr Leu Arg Pro Lys Lys
 275 280 285

Ser Thr Pro Ala Ala Lys Lys Thr Asn
 290 295

<210> 7

<211> 708

<212> DNA

<213> Crypthecodinium

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(645)

<400> 7

cgg cac gag gta cac atg acc gag aag agg gga ctg cag ttc acg atc 48
 Arg His Glu Val His Met Thr Glu Lys Arg Gly Leu Gln Phe Thr Ile
 1 5 10 15

tgc ggc tct act ggt gag ttg gtg cag aat ctc cag gat ggt ccc act 96
 Cys Gly Ser Thr Gly Glu Leu Val Gln Asn Leu Gln Asp Gly Pro Thr
 20 25 30

gcc ttg gcg ttg tgc ctc ttt tgc ttc agc aaa att ccc gag ttg atg 144
 Ala Leu Ala Leu Cys Leu Phe Cys Phe Ser Lys Ile Pro Glu Leu Met
 35 40 45

gac acg gtc ttt ctc atc ttg aag ggc aag aag gtt cgc ttt ttg cag 192
 Asp Thr Val Phe Leu Ile Leu Lys Gly Lys Lys Val Arg Phe Leu Gln
 50 55 60

tgg tac cac cac gct acc gtg atg ctc ttc tgc tgg ttg gca ctg gct 240
 Trp Tyr His His Ala Thr Val Met Leu Phe Cys Trp Leu Ala Leu Ala
 65 70 75 80

acg gag tac acc ccg ggc ctc tgg ttc gcg gcc act aac tac ttc gtg 288
 Thr Glu Tyr Thr Pro Gly Leu Trp Phe Ala Ala Thr Asn Tyr Phe Val
 85 90 95

cac tcc atc atg tac atg tac ttc ttc ttg atg acc ttc aag acg gcc 336
 His Ser Ile Met Tyr Met Tyr Phe Phe Leu Met Thr Phe Lys Thr Ala
 100 105 110

gca aag gtc gtg aag ccc att gcc cct ctc atc acc atc atc cag atc 384

Ala Lys Val Val Lys Pro Ile Ala Pro Leu Ile Thr Ile Ile Gln Ile
115 120 125

gcc cag atg gtc tgg ggt ctc atc gtc aac ggc atc gcg atc acc act 432
Ala Gln Met Val Trp Gly Leu Ile Val Asn Gly Ile Ala Ile Thr Thr
130 135 140

ttc ttc acc acg ggc gcc tgc cag atc cag tcc gtg acg gtc tac tcg 480
Phe Phe Thr Thr Gly Ala Cys Gln Ile Gln Ser Val Thr Val Tyr Ser
145 150 155 160

gcc att gtg atg tac gct tcg tac ttc tac ctc ttc tcc cag ctc ttc 528
Ala Ile Val Met Tyr Ala Ser Tyr Phe Tyr Leu Phe Ser Gln Leu Phe
165 170 175

ctg gag gca tac gga tcc gct ggc aag aac aag aag aag ctc gcc cgc 576
Leu Glu Ala Tyr Gly Ser Ala Gly Lys Asn Lys Lys Lys Leu Ala Arg
180 185 190

gag ctc tcc cga aag atc tcc gag gct ctc ctg aat agt ggc gac gag 624
Glu Leu Ser Arg Lys Ile Ser Glu Ala Leu Leu Asn Ser Gly Asp Glu
195 200 205

gta gcc aag cac ctc aag tga actgagcgc ctcacatcttgg tctgggtccgc 675
Val Ala Lys His Leu Lys
210 215

caaattgccg cgtgcatgtg catgagatgc tgt 708

<210> 8
<211> 214
<212> PRT
<213> Crypthecodinium

<400> 8
Arg His Glu Val His Met Thr Glu Lys Arg Gly Leu Gln Phe Thr Ile
1 5 10 15

Cys Gly Ser Thr Gly Glu Leu Val Gln Asn Leu Gln Asp Gly Pro Thr
20 25 30

Ala Leu Ala Leu Cys Leu Phe Cys Phe Ser Lys Ile Pro Glu Leu Met
35 40 45

Asp Thr Val Phe Leu Ile Leu Lys Gly Lys Lys Val Arg Phe Leu Gln
50 55 60

18.07.02

Trp Tyr His His Ala Thr Val Met Leu Phe Cys Trp Leu Ala Leu Ala
65 70 75 80

Thr Glu Tyr Thr Pro Gly Leu Trp Phe Ala Ala Thr Asn Tyr Phe Val
85 90 95

His Ser Ile Met Tyr Met Tyr Phe Phe Leu Met Thr Phe Lys Thr Ala
100 105 110

Ala Lys Val Val Lys Pro Ile Ala Pro Leu Ile Thr Ile Ile Gln Ile
115 120 125

Ala Gln Met Val Trp Gly Leu Ile Val Asn Gly Ile Ala Ile Thr Thr
130 135 140

Phe Phe Thr Thr Gly Ala Cys Gln Ile Gln Ser Val Thr Val Tyr Ser
145 150 155 160

Ala Ile Val Met Tyr Ala Ser Tyr Phe Tyr Leu Phe Ser Gln Leu Phe
165 170 175

Leu Glu Ala Tyr Gly Ser Ala Gly Lys Asn Lys Lys Lys Leu Ala Arg
180 185 190

Glu Leu Ser Arg Lys Ile Ser Glu Ala Leu Leu Asn Ser Gly Asp Glu
195 200 205

Val Ala Lys His Leu Lys
210

<210> 9

<211> 1054

<212> DNA

<213> Thraustochytrium

<220>

<221> CDS

<222> (43)..(858)

<400> 9

gaattcggca cgagagcgcg cggagcggag acctcggccg cg atg atg gag ccg 54
Met Met Glu Pro
1

ctc gac agg tac agg gcg ctg gcg gag ctc gcc gcg agg tac gcc agc 102
Leu Asp Arg Tyr Arg Ala Leu Ala Glu Leu Ala Ala Arg Tyr Ala Ser
5 10 15 20

tcg gcg gcc ttc aag tgg caa gtc acg tac gac gcc aag gac agc ttc	150
Ser Ala Ala Phe Lys Trp Gln Val Thr Tyr Asp Ala Lys Asp Ser Phe	
25 30 35	
gtc ggg ccc ctg gga atc cgg gag ccg ctc ggg ctc ctg gtg ggc tcc	198
Val Gly Pro Leu Gly Ile Arg Glu Pro Leu Gly Leu Leu Val Gly Ser	
40 45 50	
gtg gtc ctc tac ctg agc ctg ctg gcc gtg gtc tac gcg ctg cgg aac	246
Val Val Leu Tyr Leu Ser Leu Leu Ala Val Val Tyr Ala Leu Arg Asn	
55 60 65	
tac ctt ggc ggc ctc atg gcg ctc cgc agc gtg cat aac ctc ggg ctc	294
Tyr Leu Gly Gly Leu Met Ala Leu Arg Ser Val His Asn Leu Gly Leu	
70 75 80	
tgc ctc ttc tcg ggc gcc gtg tgg atc tac acg agc tac ctc atg atc	342
Cys Leu Phe Ser Gly Ala Val Trp Ile Tyr Thr Ser Tyr Leu Met Ile	
85 90 95 100	
cag gat ggg cac ttt cgc agc ctc gag gcg gca acg tgc gag ccg ctc	390
Gln Asp Gly His Phe Arg Ser Leu Glu Ala Ala Thr Cys Glu Pro Leu	
105 110 115	
aag cat ccg cac ttc cag ctc atc agc ttg ctc ttt gcg ctg tcc aag	438
Lys His Pro His Phe Gln Leu Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Ser Lys	
120 125 130	
atc tgg gag tgg ttc gac acg gtg ctc ctc atc gtc aag ggc aac aag	486
Ile Trp Glu Trp Phe Asp Thr Val Leu Leu Ile Val Lys Gly Asn Lys	
135 140 145	
ctc cgc ttc ctg cac gtc ttg cac cac gcc acg acc ttt tgg ctc tac	534
Leu Arg Phe Leu His Val Leu His His Ala Thr Thr Phe Trp Leu Tyr	
150 155 160	
gcc atc gac cac atc ttt ctc tcg tcc atc aag tac ggc gtc gcg gtc	582
Ala Ile Asp His Ile Phe Leu Ser Ser Ile Lys Tyr Gly Val Ala Val	
165 170 175 180	
aat gct ttc atc cac acc gtc atg tac gcg cac tac ttc cgc cca ttc	630
Asn Ala Phe Ile His Thr Val Met Tyr Ala His Tyr Phe Arg Pro Phe	
185 190 195	
ccg aag ggc ttg cgc ccg ctt att acg cag ttg cag atc gtc cag ttc	678
Pro Lys Gly Leu Arg Pro Leu Ile Thr Gln Leu Gln Ile Val Gln Phe	
200 205 210	

19.07.00

att ttc agc atc ggc atc cat acc gcc att tac tgg cac tac gac tgc 726
Ile Phe Ser Ile Gly Ile His Thr Ala Ile Tyr Trp His Tyr Asp Cys
215 220 225

gag ccg ctc gtg cat acc cac ttt tgg gaa tac gtc acg ccc tac ctt 774
Glu Pro Leu Val His Thr His Phe Trp Glu Tyr Val Thr Pro Tyr Leu
230 235 240

ttc gtc gtg ccc ttc ctc atc ctc ttt ttc aat ttt tac ctg cag cag 822
Phe Val Val Pro Phe Leu Ile Leu Phe Phe Asn Phe Tyr Leu Gln Gln
245 250 255 260

tac gtc ctc gcg ccc gca aaa acc aag aag gca tag ccacgtaaca 868
Tyr Val Leu Ala Pro Ala Lys Thr Lys Lys Ala
265 270

gtagaccagc agcgccgagg acgctgccc cgttatcgcg aagcacgaaa taaagaagat 928

catttgattc aacgaggcta cttgctggcca cgagaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 988

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1048

ctcgag 1054

<210> 10

<211> 271

<212> PRT

<213> Thraustochytrium

<400> 10

Met Met Glu Pro Leu Asp Arg Tyr Arg Ala Leu Ala Glu Leu Ala Ala
1 5 10 15

Arg Tyr Ala Ser Ser Ala Ala Phe Lys Trp Gln Val Thr Tyr Asp Ala
20 25 30

Lys Asp Ser Phe Val Gly Pro Leu Gly Ile Arg Glu Pro Leu Gly Leu
35 40 45

Leu Val Gly Ser Val Val Leu Tyr Leu Ser Leu Leu Ala Val Val Tyr
50 55 60

Ala Leu Arg Asn Tyr Leu Gly Gly Leu Met Ala Leu Arg Ser Val His
65 70 75 80

Asn Leu Gly Leu Cys Leu Phe Ser Gly Ala Val Trp Ile Tyr Thr Ser



85

90

95

Tyr Leu Met Ile Gln Asp Gly His Phe Arg Ser Leu Glu Ala Ala Thr
100 105 110

Cys Glu Pro Leu Lys His Pro His Phe Gln Leu Ile Ser Leu Leu Phe
115 120 125

Ala Leu Ser Lys Ile Trp Glu Trp Phe Asp Thr Val Leu Leu Ile Val
130 135 140

Lys Gly Asn Lys Leu Arg Phe Leu His Val Leu His His Ala Thr Thr
145 150 155 160

Phe Trp Leu Tyr Ala Ile Asp His Ile Phe Leu Ser Ser Ile Lys Tyr
165 170 175

Gly Val Ala Val Asn Ala Phe Ile His Thr Val Met Tyr Ala His Tyr
180 185 190

Phe Arg Pro Phe Pro Lys Gly Leu Arg Pro Leu Ile Thr Gln Leu Gln
195 200 205

Ile Val Gln Phe Ile Phe Ser Ile Gly Ile His Thr Ala Ile Tyr Trp
210 215 220

His Tyr Asp Cys Glu Pro Leu Val His Thr His Phe Trp Glu Tyr Val
225 230 235 240

Thr Pro Tyr Leu Phe Val Val Pro Phe Leu Ile Leu Phe Phe Asn Phe
245 250 255

Tyr Leu Gln Gln Tyr Val Leu Ala Pro Ala Lys Thr Lys Lys Ala
260 265 270

<210> 11

<211> 421

<212> DNA

<213> *Phytophthora infestans*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(279)

<400> 11

cac acc atc atg tac act tac tac ttc gtc agc gcc cac acg cgc aac 48
His Thr Ile Met Tyr Thr Tyr Tyr Phe Val Ser Ala His Thr Arg Asn

1	5	10	15	
att tgg tgg aag aag tac ctc acg cgc att cag ctt atc cag ttc gtg				96
Ile Trp Trp Lys Lys Tyr Leu Thr Arg Ile Gln Leu Ile Gln Phe Val				
20		25	30	
acc atg aac gtg cag ggc tac ctg acc tac tct cga cag tgc cca ggc				144
Thr Met Asn Val Gln Gly Tyr Leu Thr Tyr Ser Arg Gln Cys Pro Gly				
35		40	45	
atg cct cct aag gtg ccg ctc atg tac ctt gtg tac gtg cag tca ctc				192
Met Pro Pro Lys Val Pro Leu Met Tyr Leu Val Tyr Val Gln Ser Leu				
50		55	60	
ttc tgg ctc ttc atg aat ttc tac att cgc gcg tac gtg ttc ggc ccc				240
Phe Trp Leu Phe Met Asn Phe Tyr Ile Arg Ala Tyr Val Phe Gly Pro				
65		70	75	80
aag aaa ccg gcc gtg gag gaa tcg aag aag aag ttg taa cggcgcttgt				289
Lys Lys Pro Ala Val Glu Glu Ser Lys Lys Lys Leu				
85		90		
taaaaagtct aacctcgctg taacagctta aaacacacac acacacaacg ctttgtagag				349
gaggtaagta gtggcaactc gtgtagaaat gcagcatgcc catcaaatac atcccgtatg				409
atccatacta ct				421
<210> 12				
<211> 92				
<212> PRT				
<213> Phytophthora infestans				
<400> 12				
His Thr Ile Met Tyr Thr Tyr Tyr Phe Val Ser Ala His Thr Arg Asn				
1	5	10	15	
Ile Trp Trp Lys Lys Tyr Leu Thr Arg Ile Gln Leu Ile Gln Phe Val				
20		25	30	
Thr Met Asn Val Gln Gly Tyr Leu Thr Tyr Ser Arg Gln Cys Pro Gly				
35		40	45	
Met Pro Pro Lys Val Pro Leu Met Tyr Leu Val Tyr Val Gln Ser Leu				
50		55	60	
Phe Trp Leu Phe Met Asn Phe Tyr Ile Arg Ala Tyr Val Phe Gly Pro				

18.07.02


65

70

75

80

Lys Lys Pro Ala Val Glu Glu Ser Lys Lys Lys Leu
85 90


JUDr. Petr Kalenský
advokát

SPOLEČNÁ ADVOKÁTNÍ KANCELÁŘ
VŠETEČKA ZELENÝ ŠVORČÍK KALENSKÝ
A PARTNEŘI
120 00 Praha 2, Hájkova 2
Česká republika