# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

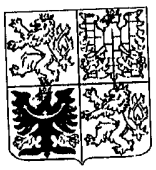
**zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.**

(21) Číslo dokumentu:

**3656-97**

(19)

ČESKÁ REPUBLIKA



ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **07. 05. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **18.05.95, 06.06.95, 22.12.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/443639, 95/471983, 95/577483**

(33) Země priority: **US, US, US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17. 06. 98**
**(Věstník č. 6/98)**

(86) PCT číslo: **PCT/US96/06452**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/36697**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[6]:

**C 12 N 5/14**
**C 12 N 15/11**
**C 12 N 15/29**
**C 12 N 15/82**
**A 01 H 4/00**

(71) Přihlášovatel:
BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF KENTUCKY, Lexington, KY, US;

(72) Původce:
Chappell Joseph, Lexington, KY, US;
Cornett Catherine A. G., Lexington, KY, US;
Yin Shauhui, Lexington, KY, US;

(74) Zástupce:
PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1273, Praha 4, 14000;

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Transkripčně-kontrolní sekvence a metody**

(57) Anotace:
Kvalitativní transkripčně-regulační sekvence funkční v rostlinách, rostlinných tkáních a v rostlinných buňkách při indukovatelné genové expresi a kvantitativní transkripčně-regulační sekvence pro zvýšení transkripční exprese genetické informace uložené ve směru transkripce v rostlinách, rostlinných tkáních a v rostlinných buňkách. Dále jsou uvedeny molekuly rekombinantních DNK a způsoby použitelné pro zlepšení odolnosti transgenních rostlin vůči nemocím zejména tam, kde indukovatelný promotor řídí expresi bílkoviny, vyvolávající hypercitlivou odpověď v rostlině.

CZ 3656-97 A3

PV 3656-97
27.03.98



# Transkripčně-kontrolní sekvence a metody

## Oblast techniky

Oblastí tohoto vynálezu je rostlinná molekulární biologie a hlavně se týká transkripčně-regulačních elementů: kvalitativně regulačních sekvencí, jež pozitivně regulují expresi genů uložených ve směru transkripce v rostlinných tkáních jako odpověď na stres vyvolaný vnikajícím mikrobiálním patogenem, elicitorem, nebo jinými indukujícími chemickými signály a kvantitativně regulačních sekvencí, jež zvyšují transkripční expresi s nimi spojených sekvencí.

## Dosavadní stav techniky

Odolnost rostlin vůči houbovým, bakteriálním a virovým patogenům je spojena se vznikem rostlinné reakce, zvané hypersensitivní odpověď. Při hypersensitivní odpovědi dochází na místě vniknutí potenciálního rostlinného patogenu k lokální smrti buněk a předpokládá se, že tato oblast lokálně odumřelých buněk zadržuje vniknuvší mikrooganismus nebo virus a chrání tak zbytek rostliny. Jiné druhy obrany rostlin jsou např. tvorba fytoalexinů (antibiotik), lytických enzymů schopných zmíněný patogen strávit, anebo modifikace buněčné stěny, které zesilují rostlinnou buněčnou stěnu proti fyzikálnímu či enzymatickému napadení.

Hypersensitivní odpověď rostlin, včetně tabáku, může zahrnovat tvorbu fytoalexinu jako součást odpovědi na vniknuvší mikroorganismus. Jedna třída sloučenin vytvářených tabákem (*Nicotiana tabacus*) jako odpověď na mikrobiální infekci jsou antibakteriální seskviterpeny.

Studium buněčných suspenzních kultur poskytlo užitečné informace týkající se regulace syntézy terpenů. Izoprenoidy jsou v přírodě velmi rozšířené a počáteční úseky jejich biosyntetické dráhy jsou společné s biosyntetickou dráhou jiných izoprenoidních sloučenin jako jsou steroly, karotenoidy, dolichol, ubichinol a regulátory růstu (např. giberelinová kyselina), jež jsou klasifikovány jako primární metabolity. Izoprenoidové sloučeniny klasifikované jako sekundární metabolity nejsou podstatné pro růst a zahrnují mono-, seskvi- a diterpenoidy. Tyto izoprenoidy, klasifikované jako sekundární metabolity jsou důležitými zprostředkovateli interakcí mezi rostlinou a jejím okolím.

K vyvolání syntézy rostlinných fytoalexinů slouží množství sloučenin. Jedná se, mimo jiné o jeden nebo více toxických iontů např. ionty rtuti, jiné chemicky definované sloučeniny, metabolické inhibitory, glykany buněčné stěny, některé glykoproteiny, některé enzymy, spóry hub, chitozany, některé mastné kyseliny a některé oligosacharidy pocházející z buněčných stěn rostlinných buněk [viz např. Sequeira, L. (1983) *Annu. Rev. Microbiol.* 37: 51-79 a odkazy tam uvedené].

Bylo ukázáno, že aktivita epi-5-aristolochen syntetázy (EAS) v tabákových rostlinách je indukována fragmenty buněčné stěny určitých druhů rodu *Phytophthora* a celulázou druhu *Trichoderma viride*, ale nikoli pektolyázou druhu *Aspergillus japonicum* [Chappell a kol. (1991) *Plant Physiol.* 97:693-698]. Napadení jinými rostlinnými patogeny nebo příbuznými avirulentními kmeny může také vyvolat syntézu fytoalexinů; např. *Pseudomonas lachrymans* indukuje syntézu seskviterpenu v tabáku [Guedes a kol. (1982) *Phytochemistry* 21:2987-2988].

Elicitiny jsou proteiny produkované rostlinnými patogeny a potenciálními rostlinnými patogeny, tyto proteiny vyvolávají hypersensitivní odpověď v rostlinách tabáku. Aminokyselinové a nukleotidové kódující sekvence elicitinu z *Phytophtora parasitica* byly publikovány [Kamoun a kol. (1993) *Mol. Plant-Microbe Interactions* 6:573-581].

Rostlinné patogenní viry, mimo jiné i virus tabákové mozaiky (Tobacco Mosaic Virus - TMV), indukují hypersensitivní odpověď v infikovaných rostlinách. Bakterie infikující rostlinu také mohou indukovat hypersensitivní odpověď a tím i odolnost proti nemoci; představiteli bakterií vyvolávajících hypersensitivní odpověď jsou mimo jiné *Agrobacterium species, Xanthomonas species* a *Pseudomonas syringae*. Rostlinné patogenní houby (a rovněž jejich určité avirulentní kmeny) také indukují hypersensitivní odpověď, jedná se mimo jiné o *Phytophtora parasitica* a *Peronospora tabaci*.

Když na suspenzní kulturu tabákových buněk působíme elicitorem, je potlačena tvorba skvalen syntetázy a tak je zastaveno využívání obecných biosyntetických prekurzorů pro tvorbu sterolů. Doprovodná indukce exprese genu seskviterpen cyklázy způsobí využití prekurzorů pro tvorbu seskviterpenů. První stupeň biosyntetické dráhy od farnesyl difosfátu k seskviterpenovému fytoalexinu capsidiolu v elicitorem indukovaných tabákových tkáních je katalyzován seskviterpen cyklázou - 5-epi-aristolochen syntetázou (EAS). Kódující sekvence a vyplývající pořadí aminokyselin pro jednoho člena rodiny EAS genů tabáku byla publikována [Facchini a Chappell (1992)

27.03.98

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 11088-11092]. Jako odpověď na působení elicitorů je indukována transkripce jednoho či více členů rodiny EAS genů.

Dlouho je pociťována potřeba vyvinutí způsobu ochrany rostlin, zvláště plodin, před infekcí rostlinnými patogeny, mimo jiné fytopatogeními viry, houbami anebo bakteriemi. Zvláště důležité jsou z hlediska ekonomiky a ochrany životního prostředí způsoby biologické neboli „přírodní", spíše než ty, které jsou založeny na používání chemikálií. Také je dlouho pociťována potřeba využití rostlinných transkripčně regulačních sekvencí pro kontrolu exprese cizorodých DNK sekvencí v transgenních rostlinách.

## Podstata vynálezu

Vynález charakterizuje rekombinantní molekulu nukleové kyseliny, jež obsahuje indukovatelný regulační element pro odolnost proti rostlinnému onemocnění. Takováto rekombinantní molekula nukleové kyseliny je obecně nejméně z 80% totožná s regulačními elementy pro odolnost proti rostlinnému onemocnění vyskytujícími se v přírodě; to jest, až 20% bázových párů referenční sekvence deoxyribonukleové kyseliny může být nahrazeno alternativními bázovými páry (např. G-C nahrazeno A-T, T-A nebo C-G), za předpokladu, že transkripční aktivita změněné sekvence je stejná nebo větší než u sekvence referenční. Ve výhodném provedení, rekombinantní molekula nukleové kyseliny připravená podle vynálezu, je získána z genu kódujícího terpen cyklázu (např. seskviterpen cyklázu). Rekombinantní regulační prvek připravený podle vynálezu, je např. získán z genu pro epi-5-aristolochen syntetázu (EAS), jež obsahuje nukleotidovou sekvenci uvedenou na Obr. 3A (Sekvence č.14) nebo indukovatelný fragment pro odolnost proti rostlinnému onemocnění z tohoto genu. Ve výhodném provedení, rekombinantní molekula nukleové kyseliny připravená podle vynálezu, má nukleotidovou sekvenci uvedenou v Obr. 3A (Sekvence č. 14).

V jiném výhodném provedení, molekuly nukleové kyseliny, připravené podle vynálezu, obsahují kterékoli z následujících sekvencí: nukleotidy 463 až 473 ze Sekvence č. 2; nukleotidy 406 až 486 ze Sekvence č.2; nukleotidy 463 až 572 ze Sekvence č.2; nukleotidy 371 až 463 ze Sekvence č.2; a nukleotidy 411 až 457 ze Sekvence č.2.

Ve výhodném provedení, rekombinantní molekula nukleové kyseliny, připravená podle vynálezu, je získána z dvouděložných rostlin (např. příslušník *Solanaceae* jako je *Nicotiana*). V jiném výhodném provedení, nukleová kyselina, připravená podle vynálezu, je získána z jednoděložných rostlin; nahosemenných rostlin či jehličnanů.

V jiném výhodném provedení, nukleová kyselina, připravená podle vynálezu, je genomová DNK; chemicky syntetizovaná DNK; nebo je kombinací genomové a chemicky syntetizované DNK; genomové DNK a cDNK; chemicky syntetizované DNK a cDNK nebo genomové DNK, cDNK a chemicky syntetizované DNK.

Ve výhodném provedení, indukce molekuly nukleové kyseliny, připravené podle vynálezu, je zprostředkována rostlinným patogenem jako je houba (např. *Phytophtora*), bakterií (např. *Pseudomonas*) nebo virem (např. virus tabákové mozaiky), jak je výše popsáno. V jiném výhodném provedení, takováto indukce je zprostředkována elicitorem (např. houbové nebo bakteriální elicitory).

Jinak řečeno, molekula nukleové kyseliny, připravená podle vynálezu, je operačně spojena s regulací indukovatelné transkripce nukleotidové sekvence kódující heterologní polypeptid. Heterologní polypeptid je schopen propůjčit rostlině odolnost proti onemocnění. Heterologní polypeptid může být elicitin (např. houbový elicitin jako je ParA1 polypeptid z *Phytophthora*, bakteriální elicitin jako je harpin, nebo farmaceutický polypeptid jako je activátor tkáňového plasminogenu). Exprese takového heterologního polypeptidu je zprostředkována jedním či více vnějšími činiteli (např. etylénem či metyl-jasmonátem). V jiném provedení, molekula nukleové kyseliny, připravená podle vynálezu, je schopna exprese heterologního polypeptidu buněčně-specifickým způsobem.

Jinak řečeno, vynález charakterizuje vektor obsahující nukleovou kyselinu, připravený podle vynálezu, způsob řízení exprese polypeptidu vnesením vektoru do buňky (např. trangenní rostlinné buňky) a buňky obsahující vektor.

Jinak řečeno, vynález popisuje způsob jak poskytnout transgenní rostlině odolnost proti nemoci, způsob obsahující tyto kroky: (a) vytvoření transgenní rostlinné buňky obsahující nukleovou kyselinu připravenou podle vynálezu, vnesenou do genomu transgenní rostlinné buňky; a (b) vypěstování transgenní rostliny z rostlinné buňky, přičemž této transgenní rostlině exprese nukleové kyseliny připravená podle vynálezu, propůjčuje odolnost proti nemoci.

Ve výhodném provedení, transgenní rostlina podle způsobu uvedeného ve vynálezu je dvouděložná rostlina (např. příslušník *Solanaceae* jako je *Nicotiana*); jednoděložná rostlina; nahosemenná rostlina či jehličnan.

Jinak řečeno, vynález popisuje způsob zvýšení transkripční exprese DNK sekvence ve směru přepisu v transgenní rostinné buňce, obsahující tyto kroky: (a) vytvoření transgenní rostlinné buňky obsahující nukleovou kyselinu, připravenou podle vynálezu, její umístění pro zvýšení transkripce DNK ve směru přepisu a její vnesení do genomu transgenní rostlinné buňky; a (b) vypěstování transgenní rostliny z rostlinné buňky.

Navíc k výše uvedeným charakteristikám, tento vynález uvádí kvalitativní transkripčně-regulační sekvence, jež regulují expresi genů umístěných ve směru transkripce v rostlinné tkáni jako odpověď na jeden či více elicitorů, jiné definované indukující sloučeniny nebo jako odpověď na stres způsobený vniknuvším fytopatogenem (indukovatelné transkripčně-regulační sekvence) a kvantitativní transkripčně-regulační sekvence, jež zvyšují transkripci sekvencí ve směru přepisu (sekvence zvyšující transkripci). Jak bylo výše doloženo příkladem, tyto transkripčně regulační sekvence se nacházejí v přírodě u tabáku proti směru přepisu genu epi-5-aristolochene syntetázy (EAS4), s nímž jsou operačně spojeny; když jsou operačně spojeny s kódující sekvencí (a v přítomnosti operačně spojeného promotorového elementu, z EAS4 genu nebo z heterologního exprimovatelného rostlinného genu), tyto sekvence zprostředkují indukovatelnou transkripční expresi této kódující sekvence když je rostlina nebo rostlinná tkáň napadená potenciálním fytopatogenem (např. virem, houbou nebo bakterií), nebo jako odpověď na elicitory, jakými jsou pro rostliny, rostlinné tkáně anebo suspenzní kultury rostlinných buněk např. celulása z *Trichoderma viridae* nebo fragmenty buněčné stěny rostlin či hub. Tento potenciální rostlinný patogen může být virus, mimo jiné např. virus tabákové mozaiky nebo *tobacco vein mottle virus*; bakterie, mimo jiné *Pseudomanas syringae*, *Xanthomonas campestris* nebo *Agrobacterium tumefaciens*; nebo houba, mimo jiné druhy rodu *Phytophthora* (např. *P. parasitica*) nebo *Peronospora* (např. *P. tabaci*). Promotor genu EAS4 obsahující indukovatelný transkripčně-regulační element (elementy) a sekvence zesilující transkripci jsou zde ukázány v Sekvenci č.2. V Sekvenci č.2 je CAAT-homologní sekvence EAS4 promotoru umístěna na nukleotidech 513 až 516 a TATA-sekvenční motiv je umístěn na nukleotidech 540 až 543.

27.03.98

Příklady indukovatelných transkripčně-regulačních elementů uvnitř EAS4 sekvence *N. tabacum* jsou od nukleotidu 458 do nukleotidu 473 v Sekvenci č.2; od nukleotidu 454 do 473 a od nukleotidu 413 do 473 v Sekvenci č.2.

Jiným aspektem tohoto vynálezu je element zesilující transkripci, odvozený z EAS4 promotoru a ze sekvencí s tímto promotorem spojených. Když je umístěn proti směru přepisu od inicializačních sekvencí a heterologní DNK, jež má být exprimována.

Dalším aspektem tohoto vynálezu jsou transgenní rostlinné buňky, rostlinné tkáně a rostliny jež byly geneticky upraveny tak, aby obsahovaly a exprimovaly cílenou nukleotidovou sekvenci, pokud možno kódující sekvenci, *antisens* sekvenci nebo jinou sekvenci, pod regulační kontrolou indukovatelného transkripčně-regulačního elementu. Cílem tohoto vynálezu je poskytnout nukleotidové sekvence jež zprostředkují indukci exprese sekvencí po směru přepisu jako odpověď na působení elicitoru, na vniknutí potenciálního fytopatogenu do rostliny, nebo na určité jiné vnější indukční signály, jako je vystavení působení metyl-jasmonátu a etylénu. Příkladem transkripčně-regulačního elementu indukovatelného elicitorem je ten z oblasti, hraničící na 5´ okraji s EAS4 genem *Nicotiana tabacum*; jak bylo doloženo příkladem, tato sekvence je ukázána v Sekvenci č.2 od nukleotidu 410 až k nukleotidu 473. Ekvivalenty uvedené nukleotidové sekvence jsou ty nukleotidové sekvence, které podobně řídí indukci exprese nukleotidových sekvencí umístěných ve směru přepisu. S výhodou je indukovatelný, transkripčně-regulační element spojován s EAS4 promotorem a s tímto promotorem spojenými sekvencemi (např. kombinace mající nukleotidovou sekvenci jak je uvedeno v Sekvenci č.2 od nukleotidu 410 do nukleotidu 573 v Sekvenci č.2, s výhodou od nukleotidu 361 do 573 v Sekvenci č.2 a ještě výhodněji od nukleotidu 1 do 573 v Sekvenci č.2).

Výraz „element regulující odolnost proti nemoci" znamená, že DNK sekvence je schopna regulovat produkt genu spojený s obrannou odpovědí rostliny (např. hypersensitivní odpověď), kterou přirozená rostlina používá v boji s patogenním organismem. Do tohoto termínu jsou také zahrnuty regulační elementy (a jak definováno dále i fragmenty takových regulačních elementů), jež jsou schopny učinit genovou expresi indukovatelnou nějakým vnějším signálem či agens spojeným s nemocí (např. patogenem či elicitorem indukované signály nebo agens jak popsáno výše). Obecně, elementy regulující odolnost proti nemocím jsou umístěny v 5´ oblasti genu, ale nejsou omezeny pouze na tuto oblast.

27.03.98

Výraz „indukovatelný" znamená, že regulační element je schopen zprostředkovat zvýšenou expresi genu (např. produkci mRNA nebo polypeptidu) jako odpověď na vztah mezi rostlinou buňkou a patogenem či elicitorem. Vynález se též týká regulačních elementů odolnosti proti nemoci, které řídí indukovatelnou expresi genu buněčně specifickým či tkáňově specifickým způsobem.

Výraz "získaný z genu" znamená, že nukleotidová sekvence regulačního elementu je založena na sekvenční informaci obsažené v přirozeně se vyskytujícím rostlinném genu (např. EAS4 v tabáku). Jakmile byl jednou zjištěn, regulační element připravený podle vynálezu je získán z přírodního zdroje nebo může být připraven pomocí jakékoli jiné standardní metody (např. metodou rekombinace či chemickou syntézou). Taková rekombinantní DNK molekula je obecně přinejmenším z 80% shodná s přirozeně se vyskytujícím rostlinným indukovatelným regulačním elementem, vyvolávajícím odolnost proti rostlinné nemoci; to jest až 20% párů bází referenční DNK sekvence může být nahrazeno alternativními bázovými páry (např. G-C nahrazeno A-T, T-A nebo C-G) za předpokladu, že změněná sekvence podporuje transkripci stejně nebo silněji, než sekvence referenční.

Výraz "indukovatelný fragment odolnosti proti rostlinné nemoci" znamená jakýkoli úsek nukleotidů bez ohledu na délku, jež je dostatečný aby řídil zvýšenou genovou expresi (např. produkci mRNA nebo polypeptidu) jako odpověď na interakci mezi rostlinou buňkou patogenem nebo elicitorem. Termín "fragment" znamená převážně délku řetězce 6-10 nukleotidů. Fragmenty DNK regulačních elementů připravené podle vynálezu, však dosahují délku 10-100 nukleotidů, délku 100-300 nukleotidů, nebo dokonce větší délku než 300 nukleotidů. Takové fragmenty jsou připraveny obvyklými postupy (např. vhodným restrikčním štěpením nebo chemickou syntézou fragmentu). Určení indukovatelného DNK fragmentu vyvolávajícího odolnost proti rostlinné nemoci je provedena standardními metodami soudobé vědy (např. metody zde popsané). V takovém případě, určení indukovatelného DNK fragmentu vyvolávajícího odolnost proti rostlinné nemoci může být provedeno standardní analýzou za pomoci metody postupného odstraňování promotoru. Konstrukce obsahující promotor odolnosti proti nemoci, který propůjčuje reportér genu operačně s ním spojenému patogenem indukovatelnou transkripci, může být v promotorové oblasti postupně zmenšována buď 5', 3' nebo *nested* delecemi, dokud efekt patogenu na reportér gen není snížen nebo zrušen. K dalšímu potvrzení, že se jedná o patogenem-indukovatelný element lze do

elementu vnášet bodové mutace. Jiný přístup jak odhadnout změny v transkripci, je připojit předpokládaný regulační element k reportér genu. Při testování kompletních promotorů je DNK fragment umístěn přímo před reportér gen zbavený vnitřní promotorové aktivity. Za použití této techniky lze otestovat jakýkoli fragment indukovatelného regulačního elementu, vyvolávajícího odolnost proti rostlinné nemoci.

Výraz "tkáňově-specifický" znamená schopnost přednostně zvýšit expresi genového produktu (např. produkci mRNA nebo polypeptidu) v jedné tkáni (např. xylém) ve srovnání s tkání jinou (např. floém).

Výraz "buněčně-specifický" znamená schopnost přednostně zvýšit expresi genového produktu (např. produkci mRNA nebo polypeptidu) v jedné buňce (např. parenchymatická buňka) ve srovnání s buňkou jinou (např. epidermální buňka).

Výraz "epi-5-aristocholen syntetáza nebo "EAS" označuje enzym schopný katalyzovat cyklizaci *trans,trans*-farnesyl difosfátu na bicyklický intermediát epi-5-aristocholen.

Výraz "patogen" znamená organismus, který pokud infikuje buňky životaschopné rostlinné tkáně, vyvolá nemoc této rostlinné tkáně.

Výraz "elicitor" znamená jakoukoli molekulu, jež je schopna vyvolat u rostliny obrannou odpověď. Příklady elicitorů zahrnují, bez omezení, jeden či více toxických iontů, např. ionty rtuti, jiné chemicky definované hmoty, metabolické inhibitory, glykany buněčné stěny, určité glykoproteiny, určité enzymy, spóry hub, chitozany, určité mastné kyseliny a určité oligosacharidy pocházející ze stěn rostlinných buněk a elicitiny (*např. harpin, kryptogein* a *pariscein*).

Výraz "elicitin" znamená bílkovinný elicitor.

Výraz "operačně spojen" znamená, že regulační sekvence a gen jsou spojeny takovým způsobem, že dojde k expresi genu, pokud vhodné molekuly (např. transkripčně-aktivační proteiny) se naváží na regulační sekvenci (sekvence).

Výraz "heterologní polypeptid" znamená jakýkoli polypeptid, který je exprimován v transformované rostlinné buňce genem, který je této transformované rostlinné buňce částečně nebo zcela cizí (tj. přirozeně se v ní nevyskytuje).

Výraz "polypeptid" znamená jakýkoli řetězec aminokyselin, bez ohledu na délku nebo post-translační modifikace (např. glykosylace nebo fosforylace).

Výraz "transformovaná rostlinná buňka" znamená buňku, do níž (nebo do jejího předka) byla vnesena rekombinantní nukleotidová sekvence (např. EAS4 promotor(-

27.03.98

1147 až +67):GUS reportér gen nebo $gEAS_{600(cykláza)}$ promotor:*parA1*- zralý elicitinový gen) DNK rekombinačními technikami (např. technikami zde popsanými).

Výraz "rostlinná buňka" znamená jakoukoli samostatně se množící buňku ohraničenou polopropustnou membránou a obsahující plastidy. Pokud má docházet k dalšímu rozmnožování, buňka musí také mít buněčnou stěnu. Výraz rostlinná buňka, jak je používán zde, zahrnuje řasy, cyanobakterie, semena, suspenzní kultury, embrya, meristematické oblasti, tkáně kalusu, listy, kořeny, výhonky, gametofyty, sporofyty, pyl a mikrospóry.

Výraz "transgenní" znamená jakoukoli buňku, obsahující DNK sekvenci vloženou do ní uměle a tato sekvence se stane částí genomu organismu, který se z buňky vyvine. V tomto patentu jsou výrazem transgenní organismy míněny obecně transgenní rostliny a DNK je vnesena do jejich organismu uměle.

Výraz "dostatečně čistá DNK" znamená DNK, která je zbavena genů nebo přidružených nukleotidů, které v přirozeném genomu organismu, ze kterého je DNK připravená podle vynálezu odvozena, sousedí s genem nebo regulačním elementem. Výraz proto zahrnuje, například rekombinantní DNK, která je zabudována do vektoru; do samostatně se množícího plasmidu nebo viru; nebo do genomové DNK prokaryontního či eukaryontního organismu; nebo která existuje jako samostatná molekula (např. cDNK, fragment genomové DNK nebo fragment cDNK vytvořený PCR nebo štěpením restrikční endonukleázou) nezávisle na jiných sekvencích. Znamená také rekombinantní DNK, která je částí hybridního genu kódujícího další polypeptidovou sekvenci nebo regulační element.

Další rysy a přednosti vynálezu budou zřejmé z následujícího popisu jeho výhodného provedení a z nároků.

Detailní popis

5-epi-aristolochen syntetáza (EAS) je klíčovým enzymem v syntéze seskviterpenoidních fytoalexinů např. u rostlin lilkovitých jako jsou, mimo jiné druhy *Nicotiana* (např. *tabacum*), *Capsicum annum* a *Hyoscyamus muticus*. EAS katalyzuje reakci farnesyl difosfátu přes (+)gemacren A a karbokationt eudasmanu na 5-epi-aristolochen. Jiné rostlin, jako jsou např. rostliny křížaté, také obsahují seskviterpen-cyklázové enzymy.

Mezi vlivy, které indukují obranné odpovědi v rostlinných tkáních či rostlinných buňkách, jako je např. syntéza fytoalexinů, patří fragmenty buněčné stěny z druhů *Phytophthora* a celuláza z *Trichoderma viridae*. Avšak pektolyáza z *Aspergillus japonicum* nepůsobí jako elicitor v kulturách tabákových buněk. Bylo zjištěno že elicitory, které vyvolávají syntézu seskviterpenových fytoalexinů, působí na úrovni kontroly transkripce klíčových biosyntetických enzymů [Vogeli a Chappell (1990) *Plant Physiol,* 94:1860-1866]. Podobné modely byly pozorovány v jiných rostlinách, avšak nebyly popsány žádné transkripčně-kontrolní sekvence, které zprostředkují indukci genu jako odpověď na napadnutí fytopatogenem.

Tabák (*N. tabacus*) obsahuje rodinu EAS genů o 12 až 15 členech, kódující sekvence EAS byly publikovány [Facchini a Chappell (1992) viz výše]. Avšak od té doby autoři tohoto vynálezu objevili, že EAS3 zřejmě není exprimován jako odpověď na působení elicitoru, a překvapivě se zdá, že nukleotidové sekvence proti směru přepisu EAS3 nezprostředkují indukci reportér genu chimérické genové konstrukce v transgenních tkáňových kulturách indukovaných elicitorem. Současně zjistili, že startovní místo pro překlad bylo v publikaci Facchini a Chappell (1992) určeno nepřesně. Nukleotidová sekvence genomového klonu EAS3, jak se objevuje v Facchini a Chappell (1992) je ukázána v Sekvenci č.7 a z ní odvozená aminokyselinová sekvence je uvedena v Sekvenci č.8.

Jinou z forem obrany rostlin proti napadení a infekci fytopatogenním mikroorganismem je hypersenzitivní odpověď, která je charakterizována nekrózou, tj. programovanou smrtí buněk v oblasti napadení rostliny patogenem. Působením elicitoru, jak bylo popsáno výše, lze také vyvolat nekrotickou odpověď.

Elicitiny jsou proteiny tvořené rostlinnými houbovými patogeny, vyvolávající v infikovaných rostlinách hypersenzitivní odpověď. Obvykle, ale nikoli nezbytně, místní smrt buněk je výsledkem elicitinem indukované odpovědi v infikované (nebo napadené) rostlinné tkáni. Tyto odpovědi zprostředkují plnou nebo částečnou odolnost proti zhoubné infekci způsobené napadajícím, potenciálně patogenním mikroorganismem. Pro účely tohoto vynálezu se považuje za široce definovaný pojem "elicitin" bílkovina rostlinného patogenu nebo potenciální rostlinný patogen, který vyvolává hypersenzitivní odpověď v rostlinné tkáni po napadení této rostlinné tkáně nebo po expresi této kódující sekvence v rostlinné tkáni.

27.03.98

Relativně dobře známý elicitin rostlinné patogenní houby je ParA1 bílkovina z *Phytophthora parasitica*. ParA1 lokus je členem rodiny genů [Ricci a kol. (1989) *Eur. J. Biochem.* 183:555-563]. Kódující sekvence i aminokyselinová sekvence produktu parA1 genu jsou popsány v Kamoun a kol. (1993) *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4:423-432 a zde v Sekvenci č.12 a Sekvenci č.13.

Další fytopatogenní proteiny s potenciální elicitinovou aktivitou byly charakterizovány, pokud jde o aminokyselinové sekvence a jiné vlastnosti [viz např. Nespoulous a kol. (1992) *Planta* 186:551-557; Huet a kol. (1992) *Phytochemistry* 31:1471-1476; Huet a Pernollet (1992) *FEBS Lett.* 257:302-306; Kamoun a kol. (1993) *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5:22-33]. Bylo charakterizováno několik avirulentních genů z patogenních bakterií, které odpovídají za elicitinovou aktivitu. Např. Keen N.T. (1990) *Annu. Rev. Phytopathol.* 24:447-463 popsal avirulentní gen z *Fulva fulvia*. Hammond-Kosack a kol. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10445-10449 popsal avr gen *Cladosporium fulvum*, který funguje stejným způsobem jako elicitin z *P. parasitica*.

Některé bakteriální patogeny rostlin také exprimují bílkoviny s podobným vlivem na hypersensitivní odpověď jako elicitin ParA1 z *P. parasitica*. Pro účely tohoto vynálezu tyto proteiny spadají do oblasti pojmu "elicitin". Mnoho homologů avirulentního genu avrBs3 z *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* bylo zjištěno v jiných variantách *X. campestris* [Bonas a kol. (1989) *Mol. Gen. Genet.* 218:127-136; Knoop a kol. (1991) *J. Bacteriol.* 173:7142-7150] a v jiných druzích rodu *Xanthomonas* [De Feyter a Gabriel (1992) *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4:423-432; Hopkins a kol. (1992) *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5:451-459]. avrD gen z *Pseudomonas syringae pv. tomato* může propůjčit avirulenci; *P. syringae pv. glycinea* vytváří pozměněný produkt avrD genu [Kobayashi a kol. (1990) ) *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3:103-111].

Předpokládá se, že elicitinové proteiny využitelné pro tento vynález, který je používán při vytváření transgenních rostlin se zdokonalenou odolností proti nemoci pomocí elicitin kódující sekvence pod regulační kontrolou transkripčně-regulačního elementu citlivého k patogenu (a s minimálním promotorem fungujícím v těchto rostlinách), musí být schopny vyvolat v těchto rostlinách expresi obranných genů (zahrnujících mimo jiné geny řídící tvorbu fytoalexinů, hypersensitivní odpověď anebo místní nekrózu). Za dnešního stavu výzkumu je známo mnoho funkčních kombinací rostlin a fytopatogenů a zkušení pracovníci vědí jak testovat působení jednotlivých elicitinů v určité rostlinné tkáni (nebo buňce) při spuštění programované smrti buněk,

27.03.98

syntéze fytoalexinů a podobně. Též se předpokládá, že působení jistých látek na rostlinné buňky nebo tkáně - např. určité celulázy hub nebo určité fragmenty rostlinných polysacharidů také někdy vyvolávají obrannou (tj. hypersensitivní) reakci hostitele. Působení takovými látkami jsou používána jako modely pro skutečné napadení rostlinným patogenem.

Rekombinantní molekula nukleové kyseliny nevyskytují se přirozeně, např. rekombinantní molekula DNK, je taková, která se nevyskytuje v přírodě; tj. je vytvořena buď přirozeným postupem za pomoci metod známých ve výzkumu, ale proces je člověkem kontrolován, aby bylo dosaženo požadovaného výsledku, nebo byla uměle vytvořena z částí odvozených z cizorodých zdrojů, tyto části se vyskytují buď přirozeně, nebo to jsou chemicky syntetizované molekuly či jejich části, tyto části se pak spojují ligací nebo jinými postupy známými z výzkumu.

Transgenní rostlina je geneticky modifikována tak, aby obsahovala a exprimovala cizorodé DNK sekvence, buď jako regulační RNK molekuly nebo jako bílkoviny. Jak je zde specificky doloženo příklady, transgenní rostlina je geneticky modifikována tak, aby obsahovala a exprimovala cizorodou DNK sekvenci operačně spojenou s takovými transkripčně-regulačními sekvencemi, jimiž není normálně regulována, tj. pod regulační kontrolou indukovatelných transkripčně-regulačních kontrolních sekvencí EAS4 genu *Nicotiana tabacum*. Označení transgenní rostlina se zde používá také pro potomstvo původní transgenní rostliny, které v sobě nese cizorodé kódující sekvence a je schopno je exprimovat pod regulační kontrolou kvalitativně anebo kvantitativně transkripčně-regulačních kontrolních sekvencí zde popsaných. Semena obsahující transgenní embrya jsou do této definice zahrnuta.

Když je požadována produkce z určitého heterologního genu nebo kódující sekvence při napadení potenciálním patogenem nebo po působení induktoru (tj. elicitoru), tato kódující sekvence je operačně připojena v *sense* orientaci ke vhodnému promotoru a pod regulační kontrolu indukovatelných regulačních sekvencí v téže orientaci jako promotor tak, že je produkována *sense* mRNK (tj. mRNK funkční pro překlad).Transkripčně terminační signál fungující v rostlinné buňce je umístěn po směru přepisu kódující sekvence. K indukovatelné expresní jednotce lze kovalentně připojit selekční znak (který může být produkován v rostlinné buňce). Ten působí po vnesení této molekuly DNK do rostlinné buňky nebo tkáně selekčně tak, že netransformované rostlinné buňky či tkáně jsou usmrceny nebo jim je zabráněno v růstu. Podobně lze

27.03.98

cizorodou kódující sekvenci exprimovat pod regulační kontrolou indukovatelného transkripčně-regulačního elementu nebo transkripci-zesilujícího elementu v suspenzní kultuře transgenních rostlinných buněk, kdy jako odpověď na přidání elicitoru do media buněčné kultury dochází k indukci.

Když je požadována inhibice genové exprese v rostlině napadené mikrobiálním patogenem jako je např. fytopatogenní houba, pak celá nebo část této kódující sekvence nebo cDNK sekvenci lze operačně připojit k promotoru fungujícímu v rostlinné buňce, ale v orientaci kódující sekvence opačné k tomuto promotoru (tj. *antisense* orientaci), takže přepisovaná RNK sekvence má komplementární sekvenci k mRNK a jako odpověď k napadení patogenem tedy vyvolána tvorba *antisense* RNK. Navíc se může mezi nukleotidy určujícími syntézu *antisense* RNK ve směru přepisu nacházet transkripčně-terminační signál.

Autoři tohoto vynálezu izolovali DNK sekvenci, jež zprostředkuje indukovatelnou expresi genů ve směru přepisu v rostlinných buňkách jako odpověď na napadení potenciálním rostlinným patogenem nebo na působení elicitoru či jiných chemických signálů. Např. kombinace etylénu a metyl-jasmonátu slouží k indukci exprese genů ve směru přepisu prostřednictvím kvalitativní transkripce regulační sekvence. Má se za to, že uvnitř této regulační sekvence je množství sekvenčních motivů, přičemž každý jednotlivý motiv odpovídá jednomu či více odlišným signálům z prostředí. Jak bylo ukázáno na příkladu, tato transkripčně-regulační sekvence je odvozena z EAS4 lokusu *N. tabacum*, a je ukázána v Sekvenci č.7. Odvozená aminokyselinová sekvence EAS proteinu je uvedena v Sekvenci č.8. Otevřený čtecí rámeček EAS4 genu, který je přerušen šesti introny, je uveden v Sekvenci č.7.

Počítačové prohledávání genové banky Genbank nenalezlo žádné známé sekvence, které by měly významnou homologii se Sekvencí č.2.

Organizace EAS genů v genomu *N. tabacum* byla popsána v Facchini a Chappell (1992) za použití EAS próby v hybridizačních pokusech podle Southerna. *Za high stringency* podmínek při analýze hybridizovalo mnoho fragmentů, což ukazuje na genovou rodinu s 12 až 16 členy v genomu tabáku. V těchto pokusech však próba obsahovala spíše kódující sekvence než promotor a s promotorem spojené sekvence.

EAS homologní geny lze vyhledat a izolovat i z rostlinných druhů jiných, než *N. tabacum*, a to na základě významného stupně homologie nukleotidových sekvencí; tj. DNK:DNK hybridizace za podmínek *moderate stringency* až *high stringency* s próbou

27.03.98

z EAS genu tabáku umožní určení odpovídajících genů u jiných rostlinných druhů. Diskusi o hybridizačních podmínkách lze kupříkladu nalézt v Hames a Higgins (1985) *Nucleic Acid Hybridization,* IRL Press, Oxford, U.K. Sekvence, které mají přinejmenším 70% homologii nukleotidových sekvencí lze obecně určit pomocí hybridizace za *moderate stringency* podmínek. Za takových podmínek se obecně dává přednost použití próby přinejmenším 100 bází dlouhé. V popisovaném případě je nejvýhodnější, když je próba odvozena z kódující části EAS4 sekvence. Pro označení hybridizační próby se používají mimo jiné radioaktivní skupiny, fluorescenční skupiny a ligandy jako biotin, k nimž se váží specifické druhy skupin (které jsou pak označeny). Je to označení, které umožňuje detekci hybridizace próby k cílové molekule nukleové kyseliny. Jiná výhodná možnost je použít dobře známou a široce přístupnou technologii polymerázové řetězové reakce (PCR) k namnožení sekvencí, majících význačnou sekvenční homologii nukleotidů s cílovou sekvencí.

Předpokládá se, že sekvence nukleové kyseliny jiné než EAS kódující sekvence uvedené v Sekvenci č.7 budou fungovat jako kódující sekvence synonymní s uvedenou EAS4 kódující sekvencí. Sekvence nukleové kyseliny jsou synonymní, pokud jimi kódované aminokyselinové sekvence jsou totožné. Degenerace genetického kódu je ve vědě dobře známa; tj. pro mnoho aminokyselin existuje více než jeden nukleotidový triplet, který slouží jako kodón pro tuto aminokyselinu. V biologických vědách je také dobře známo, že lze provést určité substituce aminokyselin v bílkovinách, které neovlivní funkci této bílkoviny. Obecně platí, že konzervativní substituce aminokyselin nebo substituce podobných aminokyselin jsou tolerovány bez vlivu na funkci bílkoviny. Podobné aminokyseliny jsou ty, které se podobají velikostí nebo nábojem, například asparagová a glutamová kyselina, nebo leucin a valin jsou páry podobných aminokyselin. Podobnost mezi aminokyselinovými páry byla hodnocena různými způsoby. Například Dayhoff a kol. (1978) v *Atlas of Protein Sequence and Structure,* Sv. 5, dodatek 3, pp. 345-352, který je zahrnut do odkazů, poskytuje tabulky frekvencí aminokyselinových substitucí, které jsou použity jako míra podobnosti aminokyselin. Tyto tabulky jsou založeny na porovnání aminokyselinových frekvencí u proteinů, majících tutéž funkci, ale pocházejících z různých, evolučně odlišných zdrojů.

Gen pro terpen cyklázu lze nalézt u lilkovitých rostlin včetně *N. tabacum* a *Hyoscyamus muticus*, jak je zde uvedeno, také u rostlin ze skupiny máty (*Labitaceae*) a *Euphorbiceae*, mimo jiné těch, u nichž bylo ukázáno že obsahují sekvence s význačnou

homologií, ale lze je v podstatě nalézt u všech rostlin. Homology EAS4 budou převážně vybírány z lilkovitých. Tyto sekvence jsou určovány hybridizačními pokusy s nukleovými kyselinami nebo, pokud budou klonovány do expresních vektorů, křížovou reakcí se specifickými protilátkami proti EAS tabáku, případně jakýmkoli jiným způsobem ve vědě známým, včetně použití PCR technologie provedené za použití oligonukleotidů odpovídajících úsekům Sekvence č.7, hlavně v oblasti kódující EAS. Protilátky se připravují immunizací experimentálních zvířat čištěným EAS jak bylo popsáno v práci Vogeli a kol. (1990) *Plant Physiology* 93:183-187 nebo za použití peptidového konjugátu, kde aminokyselinová sekvence peptidu je vybrána z hydrofilní části EAS aminokyselinové sekvence (Sekvence č.8). Technika produkce monoklonálních a polyklonálních protilátek je snadno dostupná (viz např. Campbell (1994) *Monoclonal Antibody Technology*. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Sv. 13, Burdon a Knippenberg, eds, Elsevier, Amsterdam; Harlow a Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Další možností je otestovat cDNK knihovnu (v expresním vektoru) pomocí EAS-specifických protilátek nebo připravit specifické protilátky proti EAS peptidům za pomoci peptidové sekvence (sekvencí) z hydrofilních oblastí EAS proteinu (Sekvence č.8) a dobře známé technologie.

Jak je známo zkušeným pracovníkům, indukovatelnou transkripčně-regulační sekvenci lze operačně připojit k jakékoli promotorové sekvenci funkční v rostlinách; když se má připojit regulační element k promotoru, obecně se používá pro tento účel zkrácený (neboli minimální promotor), např. zkrácený promotor z viru květákové mozaiky (Cauliflower Mozaic Virus, CaMV). Zkrácené verze jiných konstitutivních promotorů lze také použít jako zdroje CAAT a TATA-homologních oblastí; takové sekvence je možno derivovat z takových *A. tumefaciens* T-DNK genů, jako jsou *nos*, *ocs* a *mas* a rovněž z genů rostlinných virů, např. genu 19S viru květákové mozaiky (Cauliflower Mozaic Virus, CaMV). Budeme předpokládat, že cílem zkušeného pracovníka bude vybrat určité promotory, použitelné s indukovatelnými transkripčně-regulačními elementy. Budeme dále předpokládat, že když je exprimován protein vyvolávající smrt buněk, je výhodné, když v nepřítomnosti induktoru nedochází k žádné bazální transkripční (ani translační exprese). Minimalizace bazální exprese je méně

27.03.98

významná při uplatnění indukovatelných genových expresí u proteinů, jejichž genový produkt není výrazně toxický pro rostlinou buňku, která jej vytváří.

Minimální promotor obsahuje DNK sekvenční signály nezbytné pro vazbu RNK polymerázy a pro započetí transkripce. Pokud se týká promotorů RNK polymerázy II, promotor je určen TATA-homologním sekvenčním motivem umístěným 20-30 bázových párů proti směru transkripce od místa jejího startu, a CAAT-homologním sekvenčním motivem umístěným 50-120 bázových párů proti směru transkripce od místa jejího startu. Je zásada číslovat nukleotidy umístěné proti směru transkripce od místa jejího startu, postupně se zvyšujícími čísly (ve směru 5´) počínaje od místa startu. Obecně platí, že transkripce řízená minimálním promotorem je nízká a neodpovídá ani pozitivně ani negativně na signály z okolí, ani na signály pocházející z vývojových procesů v rostlinné tkáni. Příklad minimálního promotoru, vhodného pro použití v rostlinách je zkrácený promotor genu 35S z rostlinného viru květákové mozaiky (Cauliflower Mozaic Virus, CaMV), který obsahuje oblast od nukleotidů genu 35S od -90 do +8.

Indukovatelná transkripčně regulační sekvence (kvalitativní transkripčně regulační sekvence) je umístěna v oblasti mezi -167 a -100 bázových párů vzhledem k EAS4 transkripčně iniciačnímu místu (nukleotidy 406 až 473, iniciace na nukleotidu 573 v Sekvenci č.2).

Jak je známo, existuje rozmanitost mezi sekvenčními motivy, které reagují na různé podněty. Operativní připojení této sekvence bezprostředně proti směru přepisu k minimálnímu promotoru funkčnímu v rostlinné buňce navodí indukovatelnou expresi kódující sekvence připojené bezprostředně po směru přepisu za tímto promotorem, tj. heterologní kódující sekvence a zkušenému pracovníkovi jsou zřejmé prostorové a jiné požadavky pro translační expresi této kódující sekvence. Kde je žádoucí vznik odolnosti proti nemoci, navozený hypersensitivní odpovědí k napadajícímu, potenciálnímu rostlinnému patogenu, je výhodné, když heterologní sekvence kóduje elicitinu podobný protein rostlinného patogenního organismu (např. virus, bakterie nebo houba), např. sekvence kódující produkt genu parA1 (elicitin) *Phytophthora parasitica*, harpin proteiny určitých fytopatogenních bakterií mohou také sloužit jako induktory exprese, zprostředkované indukovatelnou, transkripčně regulační sekvencí z EAS4 genu. Zahrnutí dalších, ve směru 5´ umístěných sekvencí z EAS4 genu zvyšuje hladinu exprese genu umístěných ve směru přepisu. Výhodné je použití sekvence obsahující oblast nukleotidů -266 až +1 z genu EAS4 (nukleotidy 307 až 573 ze Sekvence č.2),

27.03.98

ještě výhodnější je sekvence obsahující oblast nukleotidů -567 až +1 z genu EAS4 (nukleotidy 1 až 573 ze Sekvence č.2).

Alternativou k použití připojení EAS4 transkripčně regulační sekvence k heterolognímu minimálnímu promotoru je použití promotorové oblasti EAS4 ve spojení s regulačními elementy, připojenými k tomuto promotoru v oblasti proti směru přepisu. Při tomto uspořádání lze použít nukleotidy 307 až 463, nebo ještě výhodněji pro větší hladiny exprese ve směru přepisu je použít nukleotidy 371 až 463, 311 až 462 a 10 až 573 ze Sekvence č.2.

V rostlině jako je *N. tabacum* okamžitě indukovatelný, transkripčně regulační element řídí indukci genů umístěných ve směru přepisu jako odpověď na napadení rostlinnými patogeny a určitými látkami, jako jsou některé houbové celulázy a určité fragmenty rostlinných a houbových buněk. Rostlinné patogeny, které jsou schopny spustit takovou expresi jsou mimo jiné *Xanthomonas*, *Pseudomonas syringae*, druhy *Phytophthora* včetně *parasitica* a druhy *Peronospora* (např. *tabaci*).

Kódující sekvence vhodné pro expresi v rostlinách jsou operativně připojeny ve směru transkripce k promotorové konstrukci. Transgenní rostliny lze vytvořit pomocí chimérického genu, složeného v podstatě z regulačního promotoru, jakýchkoli dodatečných sekvencí zesilujících transkripci a požadované kódující sekvence, obsahující nezbytné sekvenční signály pro její překlad. Kde je výhodné indukovat vznik odolnosti proti nemoci, jako odpověď na napadení transgenní rostlinné tkáně potenciálním rostlinným patogenem, nebo jako odpověď na působení elicitoru či jiného chemického signálu, který indukuje expresi EAS4 genu, je výhodné, když heterologní sekvence kóduje elicitin rostlinného patogenního organismu, např. produkt genu parA1 *Phytophthora parasitica* (jak popsáno v Kamoun a kol. (1993) viz výše). Jiné elicitinu podobné proteiny byly popsány v běžně dostupné vědecké literatuře a zahrnují mezi jinými proteiny od druhů *Phytophthora*, druhů *Peronospora* a druhů *Xanthomonas*.

Další možné kódující sekvence, které mohou být exprimovány pod regulační kontrolou popsaného indukovatelného, transkripčně regulačního elementu, aby zdokonalily odolnost (transgenních) rostlin nebo rostlinných tkání vystavených virovým, bakteriálním nebo houbovým patogenům, jsou mimo jiné chitináza, bílkovina obalu viru tabákové mozaiky nebo bílkovina obalu jiného rostlinného viru, virový gen NIa a další.

Další možností, jak navodit indukci takovéto regulovatelné konstrukce, je např. působení elicitoru nebo bakterie, viru nebo houby (s výhodou nepatogenní pro

27.03.98

hostitelskou rostlinu) na transgenní rostlinu nebo tkáň, tedy elementů schopných pomocí indukovatelného, transkripčně regulačního elementu indukovat expresi kódující sekvence, která sama není schopna spustit hypersensitivní odpověď, nebo odolnost proti nemoci. Kódující sekvence, které jsou s výhodou exprimovány zahrnují insekticidní proteiny, jako např. krystalické proteiny z *Bacillus thuringiensis*, které když exprimovány, mohou chránit rostlinu před hmyzími škůdci.

Syntézu fytoalexinů podle přirozeného EAS4 genu nebo indukci genové exprese zprostředkované popsaným regulovatelným EAS4 promotorem nebo indukovatelným, transkripčně regulačním elementem spojeným přinejmenším s minimálním heterologním promotorem, lze indukovat působením široké kolekce určitých chemikálií, hrubých filtrátů houbové kultury, extraktů buněčné stěny hub a oligosacharidů ze stěn rostlinných či houbových buněk na rostlinné tkáně nebo buňky [Albersheim a Valent (1978) *J. Cell. Biol.* 78:627-643]. Jiné látky schopné indukovat hypersensitivní odpověď, jsou mimo jiné, určité celulázy a určité fragmenty rostlinných nebo houbových buněk.

Transgenní rostliny mohou být vytvořeny jakýmkoli způsobem ve vědě známým, mezi jinými DNK přenosem zprostředkovaným *Agrobacterium tumefaciens*, s výhodou pomocí oslabeného T-DNK vektoru, elektroporace, přímého přenosu DNK a bombardováním částicemi (viz Davey a kol. (1989) *Plant Mol. Biol.* 13:275; Walden a Schell (1990) *Eur. J. Biochem.* 192:563; Joersbo a Burnstedt (1991) *Physiol. Plant.* 81:256; Portykus (1991) *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:205; Gasser a Fraley (1989) *Sci.* 244:1293; Leemans (1993) *Bio/Technology.* 11:1524; Koziel a kol. (1993) *Bio/Technology.* 11:194; a Vasil a kol. (1993) *Bio/Technology.* 11:1533.).

Techniky používané pro vnesení DNK do jednoděložných a také dvouděložných rostlin, stejně jako techniky pro pěstování rostlinných tkání a vypěstování rostlin z těchto tkání jsou v oboru dobře známé. Mezi jednoděložné rostliny, které byly úspěšně transformovány a regenerovány patří pšenice, kukuřice, žito, rýže a chřest. Např. US Patent číslo 5 350 689 ( 1994, Shillito a kol.) popisuje transgenní rostliny kukuřice (*Zea mays*), vypěstované z protoplastů a z buněk od nich odvozených. Aby byla tvorba transgenních rostlin efektivní, je žádoucí, aby rostlinná tkáň použitá pro transformaci, měla vysokou schopnost regenerace. Byla připravena transgenní tkáň osiky a z ní regenerována transgenní rostlina [Devellard a kol. (1992) *Transgenic Res.* 1:202-220; Tsai a kol. (1994) *Plant Cell Rep.* 14: 94-97]. Podobně byly transformovány topoly [Wilde a kol. (1992) *Plant Physiol.* 98:114-120]. Je také k dispozici laboratorní

27.03.98

technologie pro manipulaci, transformaci a regeneraci nahosemenných rostlin. Např. US Patent číslo 5 122 466 (1992, Stomp a kol.) popisuje bio-balistickou transformaci jehličnanů a to přednostně meristematické, děložní nebo hypokotylové tkáně. US Patent číslo 5 041 382 (1991, Gupta a kol.) popisuje obohacení embryonálních buněk jehličnanů.

Techniky a činidla pro vnesení a zjištění přítomnosti heterologní DNK v rostlinných buňkách nebo tkáních jsou dobře známy. Genetické znaky, umožňující výběr heterologní DNK v rostlinných buňkách jsou dobře známy, např. geny nesoucí odolnost proti antibiotikům jako jsou kanamycin, hygromycin, gentamycin nebo bleomycin. Tyto znaky umožní vybrat úspěšně transformované buňky, podle jejich růstu v médiu obsahujícím vhodné antibiotikum, neboť ponesou patřičné geny pro odolnost.

Další technikou pro genetické manipulování rostlinných buněk nebo tkání je použití expresních kazet, skládajících se z indukovatelného promotoru nebo chimerického promotoru, připojeného k heterologní kódující sekvenci a k sekvenci ukončující transkripci, vnášených do rostlinných buněk nebo tkání např. transformací pomocí *Agrobacterium*, elektroporací, mikroinjekcí, bombardováním částicemi, nebo jinými známými postupy. Je výhodné, když expresní kazeta navíc obsahuje znak, umožňující výběr heterologní DNK v rostlinné buňce, tj. genu, nesoucího odolnost proti antibiotikům jako jsou kanamycin, hygromycin, gentamycin nebo bleomycin.

Transkripčně-regulační sekvence, zvláště indukovatelný transkripčně-regulační element (nebo EAS4 promotor s indukovatelným elementem, nebo lépe s elementem podporujícím transkripci), jsou užitečné pro kontrolu exprese genů v transgenních rostlinných buňkách v suspenzní buněčné kultuře, jako alternativa exprese v transgenních rostlinách. Např. EAS4 promotor obsahující signály pro inicializaci transkripce, indukovatelný transkripčně-regulační element a element podporující transkripci mohou být použity ke zprostředkování indukovatelné exprese jedné nebo více heterologních sekvencí v transgenních rostlinných buňkách v suspenzní kultuře. Expresi požadované sekvence lze pak vyvolat přidáním elicitoru nebo jiných indukujících chemických signálů ke kultuře. Buňky v suspenzní kultuře odpovídají ve srovnání s přirozenými rostlinami na elicitory snadněji. Heterologní kódující sekvence mohou kódovat bílkoviny, které zprostředkují syntézu farmaceutických látek, syntézu poly-β-hydroxymáselné kyseliny, nebo syntézu jiných druhotných metabolitů, celulózy, škrobu, cukrů, olejů, nebo mohou heterologní sekvence kódovat farmaceutické

27.03.98

bílkoviny, insekticidní toxické bílkoviny, protihoubové bílkoviny, protivirové bílkoviny (jako jsou bílkoviny virového obalu, vyvolávající odolnost proti virové infekci), N1a bílkovinu, chitinázy, glukanázy, bílkoviny nebo sekvence samčí sterility, bílkoviny zvyšující výživnou hodnotu či obsah, nebo vývojové či tkáňově-specifické programy nebo modely. Rozumí se, že transgenní rostliny lze použít k expresi heterologních sekvencí podobně jako transgenní rostlinné buňky.

Pokud má být u transgenních rostlin indukována syntéza fytoalexinů, nebo exprese heterologní kódující sekvence pod regulační kontrolou EAS4 promotoru nebo indukovatelného transkripčně-regulačního elementu z něho odvozeného, anebo pod regulační kontrolou elementu podporujícího transkripci odvozeného rovněž z EAS4 promotoru, elicitor musí být schopen proniknout kutikulou rostlinné buňky, aby měl indukční vliv. Jinou možností je rostlinnou tkáň poranit, aby se usnadnilo či umožnilo vniknutí elicitoru do tkáně. Velké množství indukujících látek, včetně elicitorů a jiných chemických signálů, jako je směs etylénu a metyl-jasmonátu, může být efektivně přidáváno do suspenzních kultur transgenních rostlinných buněk, kde je daleko menší množství bariér pro příjem a vůbec zaznamenání elicitorů buňkou. Když se užívá pro indukci genové exprese etylén a metyl-jasmonát, etylén se používá v koncentracích mezi 1 až 50 ppm a metyl-jasmonát používá v koncentracích mezi 0,1 až 1 mM.

V následujících příkladech jsou použity mnohé techniky dobře známé a přístupné všem, kdo mají zkušenosti z molekulární biologie, s manipulací rekombinantní DNK v rostlinných tkáních a s pěstováním a regenerací transgenních rostlin. Enzymy jsou dostupné z komerčních zdrojů a jsou používány podle návodu prodejce, případně s odchylkami, běžně používanými v oboru. Chemikálie, pufry a podmínky kultivování jsou také v oboru známé. Odkazy, poskytující informace o standardních molekulárně-biologických postupech jsou např. Sambrook a kol. (1989) *Molecular Cloning*, druhé vydání, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY; R. Wu (ed.) (1993) *Methods in Enzymology* 100 a 101; Glover (ed.) (1985) *DNA Cloning,* Sv. I a II, IRL Press, Oxford, UK; a Hames a Higgins (eds.) (1985) *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, Oxford, UK. Odkazy, vztahující se k manipulaci a transformaci rostlinných tkání jsou např. R. A. Dixon (ed.) (1985) *Plant Cell Culture: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, UK; Schuler a Zelinski (1989) *Methods in Plant Molecular Biology*, Academic Press, San Diego, CA; Weissbach a Weissbach (eds.) (1988) *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, San Diego, CA; I. Potrykus (1991) *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol.*

27.03.98

*Biol.* 42:205; Weising a kol. (1988) *Annu. Rev. Genet.* 22:421; van Wordragen a kol. (1992) *Plant Mol. Biol. Rep.* 19:12; Davey a kol. (1989) *Plant Mol. Biol.* 13:273; Walden a Schell (1990) *Eur. J. Biochem.* 192:563; Joersbo a Brunstedt (1991) *Physiol. Plant.* 81:256 a další práce citované v uvedených odkazech. Používané zkratky a názvosloví jsou považovány za standardní v tomto oboru a jsou běžně užívány v odborných časopisech, které jsou zde citovány.

Všechny odkazy citované v této žádosti jsou výslovně zahrnuty do odkazů.

Následující příklady jsou poskytnuty za účelem ilustrace a nikoli s úmyslem omezit šíři vynálezu, jaká je zde nárokována. Pokud zkušený pracovník uplatní jakékoli odchylky v předvedených látkách a metodách, bude považováno, že spadají do rozsahu tohoto vynálezu.

Popis obrázků

Obr.1 ukazuje údaje získané z pokusů s přechodnou expresí GUS, který je regulován sekvencí z EAS3 a EAS4 promotorové oblasti ve srovnání s konstrukcí CaMV 35S-GUS (Cauliflower Mosaic Virus 35S promotor - β-glukuronidázový reportér gen). Tyto pokusy byly provedeny na tabákových protoplastech, do kterých byla DNK konstrukce vpravena elektroporézou.. Hodnota exprese "bez indukce" byly pro EAS-GUS konstrukce relativně vysoké, protože pro přípravu protoplastů byly použity enzymy hub, které štěpí stěny rostlinných buněk. Osa "y" ukazuje jednotky GUS aktivity a pod každým sloupcem grafu je udán rozsah EAS sekvencí ve směru 5´. Číslování je relativní vzhledem k přirozenému startu transkripce EAS4 (nebo odpovídající báze EAS3); v EAS4 (Sekvence č.2) je startovní místo na nukleotidu 573; v EAS3 (Sekvence č.1) je potenciální start transkripce na nukleotidu 489.

Obr. 2A a 2B ukazují informace týkající se exprese reportér genu, řízeného okamžitě indukovatelným transkripčně-regulačním elementem připraveným podle vynálezu. Obr. 2A ukazuje schéma experimentů, provedených s EAS4 promotorovou oblastí, kontrolující expresi GUS reportér genu ve stabilně transformovaných transgenních rostlinách. Obr. 2B ukazuje výsledky pokusů se zesílením účinku sekvencí spojených s EAS4 promotorem regulujících expresi GUS reportér genu, prostřednictvím CaMV 35S promotoru. Číslování EAS4 oblasti v Obr.2A i Obr.2B je relativní vzhledem k přirozenému startu transkripce EAS4 genu (viz též Sekvence č.2, kde transkripční

27.03.98

startovní místo odpovídá nukleotidu 573). Exprese GUS v Obr.2A i Obr.2B je měřena v jednotkách fluorescence na miligram proteinu.

Obr. 3A a 3B jsou schematické ilustrace, ukazující DNK sekvence 5´ oblasti EAS4 genu a strukturu GUS reportér genu nesoucího EAS4 promotor (-1148 až +67). Obr. 3A ukazuje nukleotidovou sekvenci 5´ oblasti EAS4 promotoru (-1148 až +67). CAAT a TATA boxy jsou zvýrazněny. Iniciační místo transkripce je označeno jako +1. Obr. 3B je schéma ukazující strukturu EAS4 promotoru (-1148 až +67):GUS reportér genu. Sekvence sousedící s EAS4 promotorem v 5´ směru (-1148 až +67) byla spojena ve správné čtecí mřížce s GUS reportér genem v binárním vektoru pBI101.1.

Obr. 4A a 4B ukazují údaje týkající se elicitorem-indukované exprese GUS genu v listech, stoncích a kořenech transgenních tabákových rostlin obsahujících EAS4 (-1148 až +67):GUS reportér gen. Obr. 4A je graf ukazující elicitorem-indukovanou GUS aktivitu v tabákových listech v průběhu 18 hodin. O6i, O8r a O9p reprezentují nezávisle transformované linie transgenního tabáku obsahující konstrukci EAS4 (-1148 až +67):GUS reportér gen. Voda (jako kontrola) nebo 25 nM kryptogeinu bylo infiltrováno symetricky a současně do listu (abaxiálně) a infiltrované zóny listové tkáně byly sbírány pro analýzu GUS aktivity v průběhu 18 hodin. Uvedené hodnoty jsou průměrem dvou oddělených pokusů. Obr. 4B je sloupcový graf ukazující GUS aktivitu indukovanou elicitorem ve stoncích a kořenech transgenních tabákových rostlin obsahujících EAS4 (-1148 až +67):GUS reportér gen. O6i a O9p reprezentují dvě nezávisle transformované linie transgenního tabáku. C-O (prázdná políčka) ukazují GUS aktivitu v plátcích kořenů a stonků bez působení elicitoru. C-18 (stínovaná políčka) a E-18 (plná políčka) ukazují GUS aktivitu v plátcích kořenů a stonků 18 hodin po inkubaci ve vodě nebo 100 nM elicitorem kryptogeinem. V každé transgenní linii bylo hodnoceno pět rostlin.

Obr. 5 je sloupcový graf ukazující GUS aktivitu indukovanou patogeny - rasou 0 a rasou 1 *Phytophthora parasitica* var. *Nicotianae* v transgenních rostlinách tabáku. Listy oddělené z jedné linie transgenního tabáku (O9p) obsahující EAS4 promotor (-1148 až +67):GUS reportér gen byly naočkovány mycelii dva dny starých kultur *P. p.* var. *Nicotianae* a pak inkubovány 24 hodin v růstových komorách při 27 °C s konstantním fluorescenčním světlem. Kontrolní listy byly naočkovány agarem připraveným z ovesné mouky. U infikovaných oblastí tkání byla pak proměřována GUS aktivita. Každý sloupec grafu ukazuje průměrnou hodnotu a standardní chybu ze tří oddělených pokusů (n=5).

27.03.98

Obr. 6 je sloupcový graf ukazující porovnání patogenem-indukované a elicitorem-indukované GUS aktivity v transgenních rostlinách po působení *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae 61*, jeho *hrpH* mutanty a čištěného bakteriálního elicitorového proteinu harpinu. Listy jedné linie transgenního tabáku 09-P) obsahující EAS4 promotor (-1148 až +67):GUS reportér gen byly infiltrovány buď 50 μg/ml čištěného elicitoru harpin z *Erwinia amylovora*, buněčnými suspenzemi divokého typu *P. syringae* pv. *Syringae 61*, nebo jeho *hrpH* mutanty ($A_{600}$ = 0,05). Po 12 hodinách inkubace byly infiltrované zóny tkání analyzovány na GUS aktivitu. Kontrolní hodnoty reprezentují GUS aktivitu pozorovanou ve vzorcích listové tkáně, které byly infiltrovány vodou. Hodnoty ukázané v každém sloupci grafu jsou průměrem výsledků získaných z pěti rostlin.

Obr. 7A a 7B ukazují Western-blot analýzu indukce 5-epi-aristolochen syntetázy (EAS) v tkáních tabáku. Bílkoviny byly extrahovány z kontrolních a z elicitorem-opracovaných tabákových listů, stonků a kořenů. Stejná množství proteinů (25 μg na linii pro list a stonek, 15 μg na linii pro kořen) byly rozděleny pomocí SDS-PAGE a přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Potom bloty reagovaly s EAS antisérem a imunoreaktivní zóny byly zviditelněny pomocí kozích proti-myších protilátek vázaných s alkalickou fosfatázou. Obr. 7A ukazuje Western-blot analýzu vzorků listových a stonkových tkání. Obr. 7B ukazuje Western-blot analýzu vzorků kořenových tkání.

Obr. 8A až 8L jsou fotografie ukazující histochemickou lokalizaci GUS aktivity indukované elicitorem v transgenním tabáku, obsahujícím EAS4 (-1148 až +67):GUS reportér gen. Listové tkáně z jedné reprezentativní linie v transgenního tabáku byly infiltrovány buď 25 nM nebo 50 nM elicitoru kryptogeinu. Po přibližně 8 hodinové inkubaci byly části tkání obarveny za použití 1 mM X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-glukuronid) pro analýzu GUS aktivity. Plátky stonku a kořene byly inkubovány s vodou nebo se 100 nM elicitoru kryptogeinu po dobu přibližně 12 hodin před barvením. Obr. 8A je fotografie ukazující elicitorem-indukovanou GUS aktivitu v transgenním tabákovém listu obsahujícím EAS4 promotor (-1148 až +67):GUS reportér gen po působení dvou elicitorových preparátů: kryptogein a parasicein, oba v koncentraci 25 nM a 50 nM (v Obr. 8A označeno jako $C_{25}$, $C_{50}$, $P_{25}$, a $P_{50}$). Obr. 8B je fotografie příčného řezu listem, ukazující elicitorem-indukovanou GUS aktivitu po působení kryptogeinu (zvětšení 75x). Obr. 8C je fotografie ukazující elicitorem-indukovanou GUS aktivitu v příčném řezu stonkového plátku po působení kryptogeinu (zvětšené 7,5x). Obr. 8D až 8F jsou fotografie ukazující při stále větším zvětšení (15x, 60x a 75x) obarvenou GUS

27.03.98

aktivitu na příčném řezu stonku, ukázaném v Obr. 8C. Obr. 8G je fotografie ukazující kořenovou špičku po působení vody a obarvenou na GUS aktivitu (zvětšení 60x). Obr. 8H je fotografie ukazující elicitorem-indukovanou GUS aktivitu na podélném řezu kořenové špičky po působení kryptogeinu (zvětšené 60x). ). Obr. 8I je fotografie podélného řezu kořenem po působení vody a obarveného na GUS aktivitu (zvětšení 75x). Obr. 8J je fotografie ukazující GUS aktivitu podélného řezu kořenem po působení kryptogeinu (zvětšené 75x). Obr. 8K je fotografie podélného řezu kořenem po působení vody a obarveného na GUS aktivitu (zvětšení 95x). Obr. 8L je fotografie ukazující GUS aktivitu na příčnéhm řezu kořenem po působení kryptogeinu (zvětšené 95x). C označuje kryptogein; P označuje parasicein; c označuje cortex; ca označuje kambium; e označuje epidermis; p označuje palisádový parenchym; pe označuje periderm; ph označuje floém; pi označuje dřeňový parenchym; s označuje houbovitý parenchym; t označuje trichom; x označuje xylém; vc označuje cévní stonek.

Obr. 9 je schéma genových manipulací vedoucích ke tvorbě rostlin odolných proti nemocem. Sekvence kódující ParA1 elicitin je izolována pomocí PCR tak, aby měla BamHI a SstI konce. $gEAS4_{600}$-GUS-pBI101, který řídí expresi GUS reportér genu pod regulační kontrolou EAS promotoru je štěpena BamHI a SstI a tím uvolněn GUS gen. Potom je BamHI/SstI-štěpený amplimer vložen do velkého fragmentu vzniklého štěpením $gEAS4_{600}$-GUS-pBI101, tím vznikne $gEAS4_{600}$-parA1-pBI101, který ve vhodné rostlinné buňce nebo tkáni syntetizuje po indukci vhodným elicitorem elicitin ParA1.

Obr. 10 je sloupcový graf ukazující vyhodnocení onemocnění u nezávislých linií transgenních tabákových rostlin (*Nicotiana tabacum* cv. KY160) obsahujících parA1 zralý elicitinový gen pod kontrolou $gEAS4_{600(cyclase)}$ promotoru po naočkování samostatných listů buď rasou 0 nebo rasou 1 *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. Na ose "y" je ukázáno vyhodnocení poranění (počet poranění na list) po 72 hodinách. Osa "x" ukazuje kontrolní rostliny a nezávislé linie transgenního tabáku, které byly testovány na odolnost proti onemocnění. KY160 označuje netransformovaný *N. tabacus* cv. KY160; G označuje nezávislé linie transgenních *N. tabacus* cv. KY160, které byly transformovány konstrukcí obsahující $gEAS4_{600(cyclase)}$ promotor připojený k GUS; M označuje nezávislé linie transgenních *N. tabacus* cv. KY160, které byly transformovány konstrukcí obsahující $gEAS4_{600(cyclase)}$ promotor připojený ke kódující sekvenci zralého parA1 elicitinu; S označuje nezávislé linie transgenních *N. tabacus* cv. KY160, které byly transformovány konstrukcí obsahující $gEAS4_{600(cyclase)}$ promotor připojený k sekvenci

27.03.98

kódující zralý parA1 elicitin včetně signální sekvence. Stínované políčko označuje naočkování oddělených listů rasou 0 *P. p.* var. *nicotianae*. Plné políčko označuje naočkování oddělených listů rasou 1 *P. p.* var. *nicotianae*.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1. EAS-specifické protilátky.

Monoklonální a polyklonální protilátky specifické pro EAS tabáku byly připraveny podle popisu Vogeli a kol. (1990) *Plant Physiology* 93:182-187. Další preparáty protilátek lze připravit známými technikami buď jako polyklonální protilátky za pomoci čištěného EAS jako antigenu, nebo pomocí peptidové sekvence vázané na nosičovou bílkovinu. Aminokyselinová sekvence peptidu pro přípravu protilátek je vybrána z mimořádně hydrofilní oblasti proteinu (Pro techniky přípravy protilátek viz. např. Campbell (1994) *Monoclonal Antibody Technology. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Sv.13, Burdon a Rnippenberg, eds, Elsevier, Amsterdam; Harlow a Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Příklad 2. Určení sekvence DNK a bílkoviny.

Určení sekvencí jednořetězcových a dvouřetězcových DNK bylo provedeno dideoxynukleotidovou terminační metodou [Sanger a kol. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:8073-8077], pomocí soupravy Sequenase kit od United States Biochemical Corp., Cleveland, OH) nebo automatickým systémem založeným na fluorescenci (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Příklad 3. Konstrukce klonu s celou EAS sekvencí.

Na suspenzní kulturu buněk *Nicotiana tabacum* L. cv. KY14 bylo působeno celulázou z *Trichoderma viride* (Type RS, Onozuka) v konečné koncentraci 0,5 µg/ml ve fázi rychlého růstu, aby došlo k indukci exprese EAS. Jako kontrola sloužily paralelní suspenzní buněčné kultury, která nedostaly celulázu. Buňky byly sebrány opatrnou vakuovou filtrací 4 hodiny po přidání elicitoru celulázy k indukované kultuře.

27.03.98

Knihovna cDNK byla připravena ve vektoru pcDNKII (Invitrogen, San Diego, CA) z polyA+ RNA izolované z buněk *N. tabacum*, na které bylo působeno elicitorem 4 hodiny. Knihovna byla prohledána diferenciální hybridizací za použití polyA+ RNA izolované z indukovaných a kontrolních kultur. Možné pozitivní klony byly dále testovány metodou popsanou v Alvine a kol. (1979) *Methods Enzymol.* 68:220-242. Domněle pozitivní EAS cDNK klony byly dále použity jako hybridizační próby pro izolaci dalších cDNK a genomových klonů. Genomová knihovna pro toto prohledání byla připravena vnesením DNK připravené z hypokotylu *N.tabacum* L. cv. NK326 a částečně štěpené MboI do vektoru λEMBL3. Při tomto prohledávání bylo nalezeno 8 nezávislých klonů z nichž každý asi představoval odlišné chromozómové místo. EAS4 a EAS3 genomové klony byly popsány v Facchini a Chappell (1992), ale dnes je známo, že byly nekompletní.

Facchini a Chappell (1992) chybně určili startovní místa pro překlad u popsaného genomového klonu v sekvencích kódujících EAS3 a EAS4. Správná startovní místa pro překlad v sekvencích kódujících EAS3 a EAS4 byla určena jako methioninové kodóny 165 bázových párů proti směru přepisu od ATG kodónů, dříve považovaných za startovní místo pro překlad. Správné startovní místo pro EAS4 bylo zmapováno pomocí jak pokusů typu primer-extension pro určení startovního místa pro přepis, tak pomocí dalších údajů o sekvenci aminokyselin na N-konci čištěného enzymu.

Amplimer o délce 110 bázových párů byl připraven polymerázovou řetězovou reakcí, aby poskytl DNK sekvenci odpovídající aminokyselinám 56-92 z EAS4 bílkoviny (viz. Sekvence č.12) a Facchini a Chappell (1992). Tento amplimer byl použit jako hybridizační próba pro prohledání cDNK knihovny ve vektoru pcdNAII (Invitrogen, San Diego, CA) připravené z polyA+ RNK izolované z kultury tabákových buněk 4 hodiny po působení elicitoru (celuláza z *Trichoderma viride*). Tento amplimer byl vytvořen pomocí sense primeru (ATGCTGTTAGCAACCGGAAGG; Sekvence č.3) a reversního primeru (ATCCAAAATCTCATCAATTTC; Sekvence č.4), a genomového EAS4 templátu ve standardní PCR reakci [Saiki a kol.(1988) *Science* 239:487-491]. Amplimer o délce 110 bázových párů byl izolován polyakrylamidovou elektroforézou za použití papíru DE-81 (Whatman International, Inc., Clifton, NJ). Izolovaný fragment byl pak radioaktivně označen [$\alpha$-$^{32}$P]-dCTP pomocí soupravy pro metodu náhodných primerů od Stratagene (La Jolla, CA) a použit jako hybridizační próba pro cDNK knihovnu, jak bylo popsáno

27.03.98

dříve [Hanahan a Meselson (1980) *Gene* 10:63-67]. Ukázalo se, že u nejdelšího klonu získaného v těchto pokusech, chybí 80 bázových párů 5´ kódující sekvence.

Aby byl získán klon o plné délce, byl použit přístup RT/PCR. První řetězec cDNK byl připraven z polyA+ RNK získané z tabákových buněk po indukci elicitorem, jak bylo popsáno [Facchini a Chappell (1992)] pomocí reversního primeru se sekvencí ATGAGTCCTTACATGTGA (Sekvence č.5). Tato sekvence odpovídá nukleotidům 459 až 477 po směru přepisu od startovního místa pro překlad. Reversní transkriptázová reakce byla provedena v 10 μL reakci (1 μg polyA+ RNK, 25 pmol reversního primeru, 10 mM DTT, 2,5 mM každého dATP, dGTP, dCTP a dTTP, 8 jednotek RNázy Block I (Stratagene, La Jolla, CA), syntéza 1. řetězce, při níž byl použit pufr podle návodu výrobce (Stratagene) probíhala 1 hodinu při 37 °C. Reakce byla ukončena zahřátím na 99 °C po dobu 5 min. Pak bylo k reakci přidáno 40 μL master mix PCR; master mix PCR obsahovala 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,01% Tween-20, 0,01% (w/v) gelatin, 0,01% NP-40, 2,5 mM každý deoxynukleotidtrifosfát, 1 jednotku TaqI polymerázy a 25 pmol foreward primeru (GGGAGCTCGAATTCCATGGCCTCAGCAGCAGCAGTTGCAAACTAT, Sekvence č.6, EcoRI a NcoI rozpoznávací místa jsou podtržena a ATG startovní místo pro překlad je vyznačeno tučným písmem). PCR byla provedena za standardních podmínek [Back a kol. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* 315:523-532].

Reakční produkt 492 bázových párů dlouhý byl štěpen pomocí EcoRI a HindIII a klonován do vektoru pBluescript SK (Stratagene). Fragment HindIII/XhoI pocházející z jiného, částečného cDNK klonu byl následně klonován do odpovídajících míst v 5´ oblasti sekvence tohoto klonu, čímž byl získán cDNK clon o plné délce, pojmenovaný pBSK-TEAS. DNK klonu pBSK-TEAS byla transformována do *Escherichia coli* TB1 pomocí $CaCl_2$ metody [Sambrook a kol. (1989)]. Zjištění DNK sekvence insertu potvrdila, že plasmid má očekávanou a požadovanou strukturu (dideoxynukleotidová terminační metoda, United States Biochemical Corp., Cleveland, OH).

Příklad 4. Určení sekvence homologní k EAS.

Genomová DNK byla izolována z listu tabáku metodou podle Murray a Thompson (1980) *Nucleic Acids Research* 8:4321-4325. Vzorky této DNK byly štěpeny požadovanými restrikčními enzymy, štěpené DNK rozděleny elektroforézou v 0,8% agarózovém gelu a takto podle velikosti rozdělené DNK byly přeneseny na nylonovou

27.03.98

membránu. DNK bloty byly hybridizovány s cEAS1, který byl radioaktivně značen pomocí metody náhodných primerů, a na 5´ konci kódující oblasti zkrácen (podle Sambrook a kol. (1989) při 60 °C v 0,25 M pufru fosfátu sodného, pH 8,0, obsahujícího 0,7% SDS, 1% hovězí sérumalbumin, 1 mM EDTA. Blot byl 2x promyt při 45 °C v 2xSSC, 0,1% SDS a 2x v 0,2xSSC, 0,1% SDS (1x SSC je 0,15 M NaCl, 0,015 M citrát sodný, pH 7,0). Relativní úroveň hybridizace byla určeny z autoradiogramů za pomoci video denzitometru (MilliGen/Biosearch, Ann Arbor, MI).

Facchini a Chappell (1992) popsali výsledky hybridizačních pokusů, provedených metodou podle Southerna, ukazovaly na přítomnost 12 až 16 kopií EAS homologních genů v genomu *N. tabacum*. K ověření přítomnosti významně homologních sekvencí k EAS tabáku a jejich zřejmý počet jejich kopií v genomu, byly provedeny hybridizace Southernovou metodou s použitím DNK izolované z jiných druhů rostlin.

Genomové DNK, štěpené restrikčními endonukleázami, jsou rozděleny elektroforézou v agarózovém gelu (0,8% agaróza) a pak přeneseny na membránu Hybond-$N^+$ (Amersham Corp., Arlington Heights, IL). Radioaktivní značení prób, obsahujících kódující sekvence z EAS a hybridizace s nimi jsou provedeny v podstatě jak popisuje Sambrook a kol. (1989). Jsou použity mírnější hybridizační podmínky (hybridizace v 4xSSC při 65 °C), poslední promytí je provedeno v 1xSSC při 65 °C.

Další možností je provedení PCR a použít jako templát cílovou DNK a primery odvozené z vysoce konzervativních kódujících oblastí EAS4 (viz Sekvence č.7), což jsou známé postupy.

Příklad 5. Detekce bílkoviny EAS.

Enzymatickou aktivitu exprimovaného produktu lze potvrdit pomocí techniky popsané v Facchini a Chappell (1992) a v Back a kol. (1994) *Arch. Biochim. Biophys.* 315:527-532.

Pro detekci bílkovinného materiálu, křížově reagujícího s EAS, jsou připraveny celkové bílkovinné frakce ze 100 µL vzorků bakteriální kultury, koncentrované centrifugací 2 minuty v mikrocentrifúze. Po odstranění supernatantu je buněčný sediment resuspendován v 100 µL 50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10 mM dithiothreitol, 2%

27.03.98

dodecylsulfátu sodného, 0,01% bromfenolová modř a 10% glycerol. Pro imunologickou detekci jsou 15 μL vzorky děleny elektroforézou v 11,5% SDS-polyakrylamidovém gelu; pro barvení proteinů Coomassie blue jsou elektroforézou děleny 35 μL vzorky. Pro přípravu vzorků rozpustných bílkovin jsou buňky zpracovány postupem jako při určování enzymatické aktivity (viz. Back a kol. (1994) nebo Facchini a Chappell (1992)). Pro imunologickou detekci jsou 15 μL vzorky děleny elektroforézou stejně, jak bylo popsáno výše; pro barvení proteinů Coomassie blue jsou elektroforézou děleny 10 až 50 μL vzorky.

Po elektroforéze jsou bílkoviny barveny Coomassie blue, nebo jsou přeneseny na nitrocelulózovou membránu, jak bylo dříve popsáno při imunologické detekci [Towbin a Gordon (1984) *Journal of Immunological Methods* 72:313-340]. Po inkubaci 30 minut v 5% nízkotučném mléce připraveném v 1xTBS (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl), byly nitrocelulózové bloty inkubovány přes noc v tomtéž roztoku, obsahujícím monoklonální protilátky specifické pro EAS tabáku (v ředění 1:1000; Vogeli a kol. (1990) *Plant Physiology* 93:182-187). Kozí anti-myší protilátky vázané s alkalickou fosfatázou a specifické chromogenové barvivo byly pak inkubovány, aby se zviditelnily EAS-specifické protilátky vázané na bílkoviny, fixované na nitrocelulózových membránách [Leary a kol. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4045-4048].

Příklad 6. Genomový klon EAS4.

cDNK klon zkrácený na 5´ konci, který byl popsán v Facchini a Chappell (1992) byl použit jako hybridizační próba při prohledání genomové knihovny *N. tabacum* cv. NK326, připravené ve vektoru λEMBL3 (Clontech, Palo Alto, CA). DNK sekvence byly ověřeny za použití běžných klonovacích a DNK sekvenačních postupů.

DNK a z ní odvozené aminokyselinové sekvence EAS4 genomového klonu jsou ukázány v Sekvenci č.7 a Sekvenci č.8.

Příklad 7. Vytváření transgenních rostlin.

Pro studia funkce nepřekládaných částí oblasti, umístěné proti směru transkripce v EAS4 genu, byly do pBI101 (Clontech, Palo Alto, CA) klonovány HindIII/BamHI fragmenty z této oblasti tak, že v transformovaných rostlinných buňkách lze pak testovat expresi reportér genu - β-glukuronidázy (GUS). Sekvence sousedící v 5´ směru s EAS3 genem je ukázána v Sekvenci č.1 a sekvence sousedící v 5´ směru s EAS4 genem je

27.03.98

ukázána v Sekvenci č.2. V každé z těchto sekvenci je startovní místo pro překlad (ATG) na posledních třech nukleotidech. Pomocí techniky primer-extension bylo určeno startovní místo pro přepis na nukleotidu 573 v Sekvenci č.2. Motivy CAAT- a TATA-boxů byly nalezeny na nukleotidech 429 až 432 a na nukleotidech 456 až 459 v Sekvenci č.1 (EAS3) a na nukleotidech 513 až 516 a na nukleotidech 540 až 543 v Sekvenci č.2 (EAS4).

Transformované linie rostlinných buněk byly vytvořeny modifikovanou metodou transformace pomocí *Agrobacterium tumefaciens*. Rekombinantní plasmidy, obsahující sekvence vnášené do rostlinných tkání, byly přeneseny do kmene *A. tumefaciens* GV3850 pomocí metody křížení třech rodičů s *E. coli* TB1 (pRK2013). Listy *N. tabacum* v různých stádiích růstu byly rozkrájeny na kousky 1 $cm^2$ a ponořeny do suspenze buněk *Agrobacterium* ($10^4$ až $10^5$ buněk/ml). Po 3 až 10 minutách byly kousky listů omyty ve sterilní vodě, aby byl odstraněn nadbytek bakteriálních buněk a omezen problém s nadbytečným růstem bakterií na zpracovávaných kouscích listů. Po krátkém osušení (30 až 60 vteřin), byly kousky listů umístěny na povrch kultivačního média pro tkáňové kultury bez antibiotik, aby se podpořila infekce tkáně a přenos DNK z bakterií do rostlinné tkáně. Kultivační médium pro tkáňové kultury obsahuje v litru: 4,31 g základní směsi solí podle Murashige a Skoog (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO), 2,5 mg benzylaminopurinu (rozpuštěný v 1 N NaOH), 10 ml roztoku indoloctové kyseliny o koncentraci 0,1 mg/ml, 30 g sacharosy, 2 ml Gamborg´s Vitamin Solution (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) a 8 g agaru. pH je upraveno mezi 5,5 až 5,9 pomocí NaOH. Po dvou dnech byly kousky listů přeneseny na kultivační médium pro tkáňové kultury obsahující 300 μg/ml kanamycinu, 500 μg/ml mefoxinu (Merck, Rathway, NJ). Kanamycin vyselektuje transformovanou rostlinou tkáň a mefoxin působí proti buňkám *Agrobacterium*.

Během procesu transformace je nutno minimalizovat dobu působení buněk *Agrobacterium* na rostlinou tkáň, aby se omezila možná indukce regulované parA1 kódující sekvence během přípravy transgenních rostlinných buněk, což by vedlo k vyvolání odpovědi buněčné smrti. Proto je biobalistická technika pro vnášení heterologní DNK, která obsahuje geny pro buněčnou smrt pod regulační kontrolou indukovatelných transkripčně-regulačních elementů, užitečná alternativní transformační technika, protože nevyžaduje ani použití buněk *Agrobacterium*, ani použití enzymů houbového původu, štěpících buněčnou stěnu (jsou nezbytné pro tvorbu protoplastů při

27.03.98

elektroporaci), jež obojí vedou k indukci kódujících sekvencí pod kontrolou tohoto regulačního elementu.

Transgenní rostliny byly regenerovány v podstatě tak, jak bylo popsáno v Horsch a kol. (1985) *Science* 227:1229-1231.

Výsledné transgenní rostliny byly testovány na expresi reportér genu β-glukuronidázy (GUS) za použití 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glukuronové kyseliny, jak v kontrolních, tak indukčních podmínkách podle Jefferson a kol. (1987) *EMBO Journal* 6:3901-3907. Indukující podmínkou je přidání celulázy z *T. viride* k tkáni transgenních tabákových rostlin (mechanickým pipetovacím zařízením se přidá 50 až 100 μl nebo 10 až 100 nM bílkovinu (např. kryptogein) indukující sloučeniny k tkáni); u kontrol byla infekce simulována, ovšem bez přidání elicitoru. Tkáně tabáku byly v některých pokusech porušeny skalpelem, aby se usnadnilo působení indukujících látek.

Příklad 8. Deleční analýza promotoru a s ním spojených oblastí.

DNK sekvence odvozená z EAS4, obsahující oblast -567 až +67 bázových párů vzhledem k startovnímu místu přepisu (nukleotidy 6 až 642, Sekvence č.2, EAS4) byla nahrazena 35S promotorem viru květákové mozaiky (Cauliflower Mozaic Virus, CaMV) [Benfey a kol. (1990) *EMBO Journal* 9:1677-1684] ve vektoru pBI221 obsahujícím jako reportér gen β-glukuronidázu (GUS) (Clontech, Palo Alto, CA). Deleční mutanty, v oblastech umístěných proti směru přepisu genu EAS4, pak byly izolovány pomocí restrikční endonukleázy. Analýza konstrukcí gEAS promotor-GUS byla provedena v protoplastech tabákových buněk, do kterých byly vpraveny elektroporací (Obr.1) a v stabilně transformovaných tabákových liniích (Obr. 2A, Tab. 1). Předběžné údaje o přechodné expresi ukázaly, že Sekvence č.1 nefunguje při indukci elicitorem a Sekvence č.2 funguje v regulovatelné genové expresi.

Údaje o přechodné expresi získané s protoplasty *N. tabacum*, do kterých byly vnášeny konstrukce různých EAS3 a EAS4 promotorů s GUS reportér genem, jsou ukázány v Obr. 1. Postupné odstraňování 5´ konce EAS4 promotorové oblasti snižuje hladiny exprese, ale indukovatelnost je zachována pro konstrukce obsahující oblasti do nukleotidů -262, do -202 a do -110 (vzhledem k startovnímu místu přepisu, nacházejícím se v Sekvenci č.2 na nukleotidu 573). Tyto údaje ukazují, že přes promotorovou oblast EAS3 v těchto konstrukcích dochází jen k velmi nízké úrovni

27.09.96

exprese GUS. Podobně 35S promotor viru květákové mozaiky (CaMV) samotný není indukován působením elicitoru.

Údaje na Obr. 2A a 2B ukazují, že odstranění genetického materiálu mezi nukleotidy -567 až -160 snižuje hladinu exprese genů, umístěných ve směru přepisu, ale nelikviduje indukovatelnost této exprese. Proto se zdá, že DNK sekvence mezi nukleotidy -567 až -160 obsahují elementy podporující transkripci. Většina této aktivity, zvyšující transkripci, se zdá být umístěna mezi nukleotidy -567 až -212, ale další zvýšení se zdá být zprostředkováno sekvenční informací mezi nukleotidy -212 až -160 vzhledem k startovnímu místu přepisu (startovní místo přepisu je 573; -567 je nukleotid 1, -212 je nukleotid 361 a -160 je nukleotid 413, vše v Sekvenci č.2).

Údaje v Obr. 2B ukazují, že DNK informace nezbytná pro zprostředkování indukce jako odpovědi na působení elicitoru, je umístěna mezi vzhledem k startovnímu místu přepisu EAS4 (tj. mezi nukleotidy 413 až 486 v Sekvenci č.2). V těchto pokusech byly sekvence odvozené z EAS umístěny před 35S promotor viru květákové mozaiky (CaMV) [Benfey a kol. (1990) *EMBO J.* 9:1677-1684]. Tento obrázek rovněž ukazuje, že transkripčně-regulační oblast funguje pokud je spojena s minimálním heterologním promotorem.

Při rozsáhlejší analýze nezávislých transformantů byly před reportér gen GUS (β-glukuronidáza) ve vektoru pBI101 (Clontech, Palo Alto, CA) vkládány buď úplná sekvence EAS4 genu (oblast nukleotidů -567 až +67), nebo její delece, provedené na 5´ konci. Úroveň exprese reportér genu GUS byla měřena za indukčních i neindukčních podmínek. Oblast 160 bázových párů od startovního místa přepisu EAS4 postačovalo k regulaci reportér genu GUS, třebaže přítomnost dalších sekvencí z oblastí proti směru přepisu zprostředkovalo zvýšení této exprese. Konstrukce obsahující oblast minimálně 167 bázových párů proti směru přepisu od startovního místa přepisu EAS4 genu dala po elektroporaci vznik přechodné genové expresi v protoplastech a umožnila tak indukovat elicitorem expresi reportér genu GUS (minimálně 2,5 násobné zvýšení genové exprese). Naopak se zdá, že oblast proti směru přepisu genu EAS3 (Sekvence č.1) nepodporuje vysoké hladiny exprese reportér genu v přechodných expresních systémech, ani neudělí indukovatelnost elicitorem reportér genům, umístěným ve směru přepisu.

Exprese reportér genu GUS indukovatelná elicitorem byla v protoplastových systémech očekávána, protože protoplasty byly vytvořeny pomocí houbových enzymů,

27.09.99

štěpících buněčnou stěnu. U těchto enzymů bylo ukázáno, že v rostlinách vyvolávají tvorbu fytoalexinů a expresi seskviterpen cyklázy [Chappell a kol. (1991) *Plant Physiology* 97:693-698]. Možné vysvětlení, proč protoplasty odpovídají na druhé působení elicitoru je, že buňkám bylo umožněno zotavení po dobu 6 až 8 hodin před druhým působením. Tato zotavovací fáze buňkám umožňuje, aby se navrátily do stavu citlivosti na elicitor.

pBI101 je komerčně dostupný od Clontech (Palo Alto, CA). Obsahuje 35S promotor viru květákové mozaiky (Cauliflower Mozaic Virus, CaMV), umístěný proti směru přepisu od reportér genu GUS, to vše ve vektoru pUC19; tím je vhodným vektorem pro testování přechodné exprese, kdy je rekombinantní vektor vnášen do rostlinných protoplastů. Přítomnost tohoto plazmidu a jeho derivátů je selektována růstem v přítomnosti kanamycinu. Podobně GUS kazeta bez promotoru připravená v binárním plazmidovém vektoru pBIN19 (Bevan a kol. (1984) *Nucl. Acids Res.* 12:8711) nese gen resistence proti kanamycinu, exprimovatelný v rostlinách.

Příklad 9. Určení indukovatelného transkripčně-regulačního elementu.

Oblast na 5´ konci genomových EAS3 a EAS4 klonů byla mapována pomocí protekce proti S1 nukleáze a metodou extenze primerů [Sambrook a kol. (1989)]. Subklony obsahující až 1000 bázových párů umístěných ve směru 5´ od startovního místa překladu bylo sekvenováno a pro studie v transgenních rostlinných tkáních připojeno k reportér genu β-glukuronidázy (GUS) v pBI101. Výsledné rekombinantní plazmidy pak byly vpraveny elektroporézou do protoplastů tabáku. Aktivita genu GUS byla měřena pokusy, zjišťujícími přechodnou expresi, také byly izolovány stabilně transformované tabákové buňky pro studia GUS indukce a exprese.

Byly připraveny konstrukce v modifikovaném vektoru pBI101, které obsahovaly minimálně 200 bázových párů umístěných ve směru 5´ od startovního místa přepisu EAS4 genu a reportér gen β-glukuronidázy (GUS). U nich pak byla zjišťována schopnost řídit regulovanou expresi GUS. 200 bázových párů z hraniční oblasti se zdá být dostatečných pro řízení přechodné genové exprese v elektroporézovaných protoplastech a propůjčují GUS expresi indukovatelnost elicitorem (minimálně 2,5 násobná indukce). Podobné pokusy se sekvencí z hraniční oblasti EAS3 genu naznačují, že 200 bázových párů z EAS3 lokusu nevyvolají ani vysoké hladiny exprese GUS genu, ani schopnost transformovaných rostlinných buněk reagovat na elicitor.

27.03.98

Celuláza a elicitiny z *Phytophthora* [Ricci a kol. (1989) *Eur. J. Biochem.* 183:555-563] slouží k indukování genové exprese, zprostředkované regulačními sekvencemi odvozenými z EAS4.

Další studie, týkající se určení sekvencí důležitých při zprostředkování indukované genové exprese jako odpovědi na napadení patogenem, kdy byly jako modely použity celuláza nebo elicitiny, byly provedeny po místně-specifické oligonukleotidové mutagenezi [Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492] domnělé regulační oblasti EAS4. Záměna GT za původní CA v posici -233 až -234 vzhledem k startovnímu místu přepisu (nukleotidy 334 až 335 v Sekvenci č.2) se nezdají měnit expresi reportér genu GUS, jak bylo měřeno v průběhu 20 hodin po inkubaci s eliciorem (celulázou).

Předběžné pokusy s vlivem metylace a gelové retardační studie provedené v podstatě jak bylo popsáno dříve [Sambrook a kol. (1989)] naznačují, že oktamerní sekvence soustředěná kolem nukleotidu -233 vzhledem k startovnímu místu přepisu (soustředěné kolem nukleotidu 334 v Sekvenci č.2) váže proteiny z jader rostlinných buněk. Údaje o vlivu metylace naznačují, že G v poloze -233 bylo přednostně chráněno proti metylaci DMS (dimetylsulfátem), pokud mohlo napřed reagovat s jadernými extrakty. Výsledky gelových retardačních studií se shodovaly s výsledky získanými z metylačních pokusů. Když byly fragmenty obsahující oblast nuklotidů -343 až -140 (vzhledem ke startovnímu místu překladu) (nukleotidy 230 až 433 v Sekvenci č.2) zkoušeny po reakci s jadernými extrakty, pohyblivost v nativním gelu při polyakrylamidové elektroforéze se jevila jako zpomalená. Navazování bílkovin bylo zrušeno záměnou GT za CA na pozicích -234 až -233. Podobné výsledky byly zjištěny při použití extraktů z kontrolních a elicitorem-indukovaných buněk, přičemž exprese reportér genu nebyla touto záměnou 2 bází pozměněna. Lze tedy uzavřít, že oblast kolem -233 se přímo neúčastní indukce genové exprese jako odpovědi na napadení patogenem či na působení elicitoru.

Předběžné pokusy naznačují, že EAS4 DNK sekvence mezi -253 až -48 vzhledem ke startovnímu místu přepisu (mezi nukleotidy 320 až 525 v Sekvenci č.2), mají kvalitativní a kvantitativní vliv na expresi reportér genu, umístěného ve směru přepisu. Sekvence EAS4 genu mezi -110 až -1 vzhledem ke startovnímu místu přepisu EAS4 (nukleotidy 463 až 572 v Sekvenci č.2) zprostředkují indukovatelnou odpověď, zatímco sekvence EAS4 genu mezi -202 až -110 vzhledem ke startovnímu místu

27.03.98

přepisu EAS4 genu (nukleotidy 371 až 463 v Sekvenci č.2) zvyšují úroveň jak indukované tak neindukované exprese reportér genu.

Příklad 10. Konstrukce chimérického EAS4 promotoru (-1148 až +68) spojeného s reportér genem GUS.

V jiné řadě pokusů byla zkoušena aktivace EAS4 promotoru (-1148 až +67) v transgenních tabákových rostlinách. Pro získání oblasti sekvence hraničící na 5´ kraji s promotorem EAS4 genu tabáku (-1148 až +67), byl izolován z gEAS4 genomového klonu, popsaného výše, přibližně 1900 bázový HindIII-HindIII fragment, obsahující 5´ část EAS4 sekvence. Izolovaný fragment byl klonován do oblasti polylinkeru plazmidového vektoru pBluescript KS(+) (Stratagene). Za použití standardní PCR metody, výsledný pKS(+) plazmid obsahující EAS4 HindIII-HindIII fragment byl použit jako DNK templát pro vytvoření přibližně 1200 bázových párů dlouhého EAS4 promotorového subfragmentu (-1148 až +67), který obsahuje nukleotidové sekvence 1148 bázových párů před a 67 bázových párů za startovním místem pro transkripci EAS4 genu. Nukleotidová sekvence tohoto fragmentu je ukázáno na Obr. 3A. 1215 bázových párů dlouhý HindIII-HindIII fragment, obsahující EAS4 promotor (-1148 až +67), byl včleněn se správnou čtecí mřížkou do kódující oblasti genu GUS v binárním vektoru pBI101.1. Obr. 3B schematicky ukazuje strukturu výsledného EAS4 promotoru (-1148 až +67) spojeného s reportér genem GUS.

Příklad 11. Exprese indukovaná elicitory či patogeny u konstrukce obsahující chimérní EAS4 promotor a gen GUS, v transgenních tabákových rostlinách.

Pro zhodnocení funkce promotoru tabákového genu EAS4 (-1148 až +67) byla v transgenních tabákových rostlinách v přítomnosti buď elicitoru nebo patogenu testována exprese reportér genu GUS v konstrukci ukázané na Obr. 3B. Exprese byla zjišťována takto.

EAS4 promotor (-1148 až +67) spojený s reportér genem GUS, zobrazený na Obr. 3B byl přenesen do oslabeného *Agrobacterium tumefaciens* kmen GV3850 pomocí metody křížení třech rodičů, popsané v Schardl a kol. (*Gene* 61: 1-11, 1987). Tabákové rostliny (*Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi*) byly pak transformovány oslabeným *Agrobacterium*, obsahujícím konstrukci s reportér genem, metodou transformace čepele listu, popsané v Horsch a kol. (*Science* 227: 1229-1231, 1985). Jako kontrolní rostliny

27.03.98

byly současně regenerovány linie transgenního tabáku exprimující reportér gen GUS pod kontrolou 35S promotoru viru květákové mozaiky (CaMV). Semena regenerovaných transgenních tabákových rostlin byly vyklíčeny na mediu, obsahujícím 100 mg/L kanamycinu. Výsledné rostliny, resistentní na kanamycin, byly zasazeny do půdy a pěstovány ve skleníku. U těchto rostlin byla zkoumána exprese reportér genu GUS výše popsaným způsobem, za použití kontrolních podmínek (s vodou) a za indukčních podmínek (působení elicitoru či patogenu).

Pro určení, jak je exprese GUS genu řízeného EAS4 promotorem (-1148 až +67) indukovatelná elicitorem, aktivita GUS byla měřena v listech transgenních tabákových rostlin, na něž bylo působeno buď houbovým bílkovinným elicitorem kryptogeinem nebo vodou, jak je popsáno dále. Polovina plně vyvinutého listu (8. list zespoda rostliny) z transgenních tabákových rostlin dva měsíce starých, byla na abaxiální straně přibližně 50 µl 25 nM kryptogeinu [připraveného podle metody Ricci a kol. *Eur . J. Biochem.* 183:555-563, 1989]; druhá polovina listu byla infiltrována podobným způsobem přibližně 50 µl vody. V různých časových intervalech po infiltraci byly zóny infiltrované kryptogeinem a vodou sebrány a měřena v nich aktivita GUS.

Jak je ukázáno na Obr. 4A, listy ze tří nezávislých linií transgenního tabáku, infiltrované 25 nM kryptogeinem ukázaly, že exprese genu GUS se indukovala asi 4 hodiny po působení elicitoru. Naopak reportér gen GUS, řízený 35S CaMV promotorem se působením elicitoru neindukoval (údaje nejsou uvedeny). Dále GUS aktivita se neindukovala v listech transgenních rostlin obsahujících EAS4 promotor (-1148 až +67) připojený k reportér genu GUS, na které bylo působeno vodou (Obr. 4A). Na mikroskopické úrovni se zjistilo, že aktivita genu GUS je omezena výlučně na oblasti listu, na které bylo působeno elicitorem, což ukazuje že nebyl indukován druhotnými signály (Obr.8A).

Pro určení orgánové specificity exprese genu GUS řízeného EAS4 promotorem (-1148 až +67), bylo na kořeny a stonky transgenních působeno elicitorem kryptogeinem a poté analyzována jejich GUS aktivita tímto způsobem. Kořeny, získané z transgenních tabákových rostlin byly udržovány až do testování na sterilním médiu podle Murashige a Skoog. Stonky (odebrané v oblasti 1 až 1,5 palce pod vrcholem) byly získány z dvouměsíčních transgenních tabákových rostlin pěstovaných ve skleníku. Před působením elicitoru byly kořeny a stonky nařezány na 15 až 30 µm silné segmenty. Segmenty kořenů a stonků pak byly inkubovány 18 hodin při pokojové teplotě na

27.03.98

filtračním papíře navlhčeném 100 μM roztokem kryptogeinu nebo vodou. Aktivita GUS v kořenových a stonkových segmentech pak byla měřena výše popsaným způsobem.

Obr. 4B ukazuje že GUS aktivita byla indukována jak v kořenech, tak ve stoncích dvou nezávislých linií transgenních tabákových rostlin po 18 hodinovém působení kryptogeinu. Jak ve stoncích tak v kořenech bylo pozorováno 15 násobné zvýšení aktivity GUS ve srovnání s kontrolními vzorky na které bylo působeno vodou. Kořeny vykazovaly vyšší aktivitu GUS než stonky. Tyto výsledky ukazují, že je indukovatelný v kořenových a stonkových tkáních působením elicitoru.

Pro určení, zda konstrukce EAS4 promotor (-1148 až +67):GUS reportér gen byl indukován houbovými patogeny, byla následujícím způsobem analyzována GUS aktivita v listech transgenního tabáku po působení dvěma různými rasami *Phytophthora parasitica* var. *Nicotinae.* Mladé, koncové listy byly odebrány z asi 45 dní starých transgenních tabákových rostlin a očkovány mycelii (asi 1 cm v průměru) z dvoudenních kultur *Phytophthora parasitica* var. *Nicotinae,* rasa 0 nebo rasa 1, rostoucích na agaru z ovesné mouky, jak bylo popsáno v Tedford a kol. (*Plant Disease* 74:313-316, 1990). Očkované listy pak byly inkubovány na filtračním papíru navlhčeném destilovanou vodou v růstové komoře při 25 °C se stálým fluorescenčním osvětlením po 24 hodin. Kontrolní listy byly očkovány čistými kousky ovesného agaru. Očkované tkáně byly poté sebrány a jejich aktivita GUS byla analyzována výše popsaným způsobem.

Jak je ukázáno v Obr. 5, aktivita GUS byla indukována v listech transgenního tabáku po působení jak rasy 0 tak rasy 1 *Phytophthora parasitica* var. *Nicotinae.* Třebaže rasa 0 nebo rasa 1 *Phytophthora parasitica* var. *Nicotinae* normálně vyvolávají odlišné symptomy onemocnění, na transgenních listech *N. tabacum* cv. *Xanthi* nebyly pozorovány významné odchylky v symptomech onemocnění, způsobených těmito dvěma rasami. Navíc bylo pozorováno, že jak rasa 0 tak rasa 1 *P. parasitica* vyvolaly stejně dobrou expresi GUS reportér genu.

Pro určení, zda je exprese GUS genu indukován bakteriálními patogeny nebo elicitory, byla následujícím způsobem analyzována aktivita GUS v listech transgenního tabáku po působení *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae 61*, její *hrp*H mutanty a elicitoru harpin z *Erwinia amylovora.* Mladé, koncové listy byly odebrány z asi 45 dní starých transgenních tabákových rostlin a očkovány buněčnou suspenzí ($A_{600}$=0,05) *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae 61* nebo její *hrp*H mutanty nebo elicitoru harpin (50μg/ml) pomocí pipety, způsobem již výše popsaným. Kontrolní listy byly očkovány

27.03.98

vodou. Po asi 12 hodinách byly tkáně sebrány a jejich aktivita GUS byla analyzována výše popsaným způsobem.

Jak je ukázáno na Obr. 6, aktivita GUS byla indukována v listech transgenního tabáku po 12 hodinách působením jak působením *Pseudomonas*, tak její *hrp*H mutanty či elicitoru harpin. Naopak nízká aktivita GUS byla zjištěna v transgenních listech po působení vody. Navíc byl pozorován vývoj hypersenzitivní odpovědi uvnitř tkáňových zón očkovaných buď divokým typem *P. syringae* pv. *Syringae 61* nebo čištěným proteinem harpin asi 12 až 15 hodin po působení. Tato výsledky naznačují, že EAS4 promotor (-1148 až +67) je aktivován jak bakteriálními patogeny, tak i bakteriálními elicitory.

Příklad 12. Imunoblotová analýza.

Exprese EAS v různých tkáních transgenních rostlin po působení kryptogeinu byla analyzována následující standardní metodou Western blotting. Proteiny byly izolovány z kontrolních tabákových tkání a z tabákových tkání po působení elicitoru kryptogein pomocí homogenizace v 80 mM K-fosfátovém pufru (pH 7,0) obsahujícím 20% (w/v) glycerol, 10 mM metabisulfid sodný, 10 mM askorban sodný, 15 mM $MgCl_2$ a 5 mM β-merkaptoetanol, jak popsali Vogeli a Chappell, viz výše. Koncentrace bílkovin byly určeny testem firmy Bio-Rad. Stejná množství bílkovin byla dělena SDS-PAGE elektroforézou, vzorky byly potom přeneseny na nitrocelulózovou membránu a imunologicky detekovány, jak popsali Vogeli a Chappell, viz výše.

Jak je ukázáno na Obr. 7A a 7B, EAS protein nebyl pomocí metody Western blotting zjištěn v listech tabákových rostlin. Naopak EAS protein byl indukován v listech transgenních rostlin po působení elicitoru. V rozřezaných stoncích a kořenech byl EAS protein zjištěn i bez působení elicitoru, což svědčí pro to, že jeden či více členů mnohočetné genové rodiny jsou tímto zraněním aktivovány, najedná se však o EAS4, jak ukazuje výše uvedená histochemická analýza.

Příklad 13. Struktura buněčně-specifické exprese konstrukce EAS4 promotor (-1148 až +67):GUS reportér gen v transgenním tabáku.

Obr. 8A až 8K ukazují výsledky získané při barevné detekci GUS aktivity v tkáních různých transgenních linií tabáku po působení elicitinů. Údaje ukázané v Obr. 8A až 8K představují řady pozorování, provedené v různých obdobích s několika

27.03.98

nezávislými liniemi transgenních tabáků, exprimujícími konstrukci EAS4 promotor (-1148 až +67):GUS reportér gen, ukázanou v Obr. 3B. Aktivita GUS byla v transgenních tkáních lokalizována barvením řezů pomocí 1 mM X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-glukuronidu) v barvícím roztoku obsahujícím 50 mM $NaPO_4$, pH 7, 0,05% Triton X-100 a 0,1% β-merkaptoetanol po dobu 12 hodin při 37 °C, řezy byly poté fixovány v 50% etanolu, 5% ledové kyselině octové a 10% formaldehydu po dobu 2 hodin. Chlorofyl byl odstraněn z vhodných tkání inkubací řezů v 70% etanolu. Řezy barvených rostlinných tkání byly prohlíženy mikroskopem Zeiss IIIRS a fotografovány MC63 mikrofotografickým přístrojem.

Jak je ukázáno v Obr. 8B až 8F, v zónách transgenních listů infiltrovaných elicitorem byla přítomna GUS aktivita, což ukazuje, že EAS4 promotor (-1148 až +67) byl aktivován jako odpověď na infiltraci kryptogeinu či parasiceinu tkání listu, výjimku tvoří pouze vrstvy epidermálních buněk, kde byla pozorována pouze minimální úroveň GUS aktivity. Podobně slabý výsledek barvení byl pozorován v epidermálních buňkách kořenů a stonků (Obr. 8G a 8L). Zatímco v epidermálních buňkách transgenních listů byla nalezena minimální aktivita GUS, v trichomech jak listů, tak kořenů transgenních rostlin byla GUS aktivita pozorována (Obr. 8B a 8L).

Navíc, jak je ukázáno v Obr. 8C až 8F a Obr. 8L, elicitorem-indukovaná GUS aktivita byla pozorována v oddělené subepidermální vrstvě jak na řezech stonků, tak i kořenů (Obr. 8C až 8F a Obr. 8L). Obr. 8F ukazuje, že GUS aktivita ve stonkových tkáních byla též přítomna v tkáňových vrstvách kambia, floému a primárního xylému; minimální GUS aktivita byla nalezena v oblastech kůry na stonku. Navíc stejně jako u stonkových tkání, GUS aktivita byla lokalizována v cévním systému kořenů (Obr. 8L).

Žádná GUS aktivita nebyla nalezena v okvětních lístcích, obsahujících zbarvené či nezbarvené tkáně, a to jak před tak po působení kryptogeinu.

Příklad 14. Deleční analýza 5′ oblasti EAS4 promotoru (-1148 až +67) v transgenních tabákových rostlinách.

V další sérii pokusů bylo vytvořeno za pomoci standardní PCR technologie několik konstrukcí EAS4 promotoru (-1148 až +67) s delecemi na 5′ konci. Tyto promotorové delece byly připojeny k reportér genu GUS, buď v pBI101.1 nebo pBI221 a následně vneseny do tabáku jak bylo popsáno výše.

27.03.98

Tabulka 1

| Delece na 5´ konci | GUS aktivita (MU/mg proteinu/minutu) | | Násobek produkce indukcí | Počet nezávislých testovaných linií |
|---|---|---|---|---|
| | Kontrola (působení vody) | Působení elicitoru | | |
| -1148 | 173 | 1889 | 10,9 | 11 |
| -567 | 120 | 921 | 7,7 | 12 |
| -212 | 23 | 187 | 8,1 | 11 |
| -160 | 2 | 34 | 17,0 | 9 |
| -115 | 3 | 3 | 1 | 12 |
| -63 | 0 | 0 | 0 | 13 |

Jak je ukázáno v Tabulce 1, odstranění oblasti nukleotidů -1148 až 567 z EAS4 promotoru má za následek snížení indukovatelné GUS aktivity na 50% úroveň nacházené v rostlinách s kompletním EAS4promotorem (-1148 až +67). Další delece promotoru až k nukleotidu -212 snižuje indukovatelnou GUS aktivitu průměrně o 90% a delece až k nukleotidu -160 snižuje GUS aktivitu na 2% aktivity nacházené v rostlinách s kompletním EAS4promotorem (-1148 až +67). Provede-li se delece až k nukleotidu -63, promotor sice stále obsahuje domnělé CAAT a TATA-boxy, avšak zcela přestane exprimovat chimérický gen jak v kontrolních listech, tak v listech, na které působil elicitor. Tyto údaje naznačují, že v oblasti -1148 až +67 jsou mnohé pozitivně regulační elementy, které kvantitativně kontrolují úroveň exprese EAS4 v tabáku.

Srovnání výsledků získaných s delecemi až k -567 a k -212 také naznačuje, že sekvence mezi -567 a -212 přispívá k úrovni exprese, neboť odstranění sekvence od -567 do -212 má za následek 4-násobné snížení úrovně exprese a ztrátu velkého množství GUS aktivity. Ačkoli delece až k nukleotidu -160 z velké části odstraní indukovatelnou GUS aktivitu, sekvence umístěné po směru přepisu od nukleotidu -160 jsou dostatečně schopny řídit indukovatelnou expresi genů v listové tkáni. Jak je ukázáno na Obr. 9B, v listové tkáni po působení elicitoru bylo pozorováno 17-násobné

27.03.98

zvýšení exprese. To ukazuje, že kvantitativní element kontrolující indukovatelnost elicitorem je umístěn mezi nukleotidy -160 až -115.

Příklad 15. Transgenní rostliny odolné proti onemocnění.

Sekvence kódující parA1 byla izolována z *Phytophthora parasitica* rasa0 následujícím způsobem: Genomová DNK byla izolována a použita jako templát v PCR se SIG forward primerem (CGTTGGATCCCCACCTCATCCGAAATGAAC; Sekvence č.9; podtrženo BamHI místo; nukleotidy 25 až 27 odpovídají startovnímu místu pro překlad) a reversním primerem (GGCTGAGCTCCTGGACGFCAGAGATCAAACC; Sekvence č.10; podtrženo SstI místo) pro namnožení kódující oblasti elicitinu ParA1, včetně sekvence kódující signální peptid. Pro izolaci amplimeru obsahujícího odpovídající kódující sekvenci elicitinu ParA1 byl použit MAT forward primer (GCCGGATCCTTATGACTAGTTGCACCACCACGCAGCAAACTG, Sekvence č.11; BamHI místo GGATTC a SpeI místo ACTAGT jsou podtržena; startovní místo pro překlad je na nukleotidech 12 až 14) a reversní primer uvedený výše (Sekvence č.10) spolu s genomovou DNK jako templátem.

Pro subklonování do plasmidu pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA) nebo do pEAS4 konstrukce byl amplimer DNK štěpen BamHI a SstI. Když byla použita sekvence kódující zralý protein, konstrukci elicitin/pEAS4 je možno štěpit SpaI a vložit rostlinnou signální sekvenci na 5´ konec otevřené čtecí mřížky. pEAS4-GUS vektor je štěpen pomocí BamHI a SstI a velký fragment DNK se vyčistí po elektroforéze v agarózovém gelu.

Obr. 9 ukazuje molekulární manipulace vedoucí k vytvoření rostlin odolných proti nemocem. Kódující sekvence pro ParA1 elicitin je izolována pomocí PCR tak, aby měla BamHI a SstI konce. $gEAS4_{600(cyclase)}$-GUS-pBI101, který řídí expresi reportér genu GUS pod regulační kontrolou EAS promotoru, je štěpen pomocí BamHI a SstI, aby se uvolnil reportér gen GUS. Pak BamHI/SstI-štěpený parA1 amplimer je vložen do velkého fragmentu vytvořeného štěpením $gEAS4_{600(cyclase)}$-GUS-pBI101 a dojde tak k vytvoření $gEAS4_{600(cyclase)}$-parA1-pBI101, který po transformaci rostlinných buněk nebo tkání, produkuje ParA1 elicitin po indukci vhodným elicitorem.

Pro zhodnocení odolnosti k rostlinným patogenům byly regenerovány transgenní rostliny tabáku (*Nicotiana tabacum* cv. KY160), obsahující buď gen pro zralý elicitin parA1 (aminokyseliny 21 až 118 ze Sekvence č.12), nebo elicitin parA1 s genetickou

27.03.98

informací pro signální sekvencí (aminokyseliny 1 až 118 ze Sekvence č.12) pod kontrolou $gEAS4_{600(cyclase)}$ promotoru. Regenerace byla provedena technikou přenosu genů pomocí *Agrobacterium*, jak bylo popsáno výše. U výsledných transgenních rostlin byla testována standardní metodou popsanou v Tedford a kol. (viz. výše) odolnost proti onemocnění způsobenému buď rasou 0 nebo rasou 1 *Phytophthora parasitica* var. *Nicotianae*. Jak je ukázáno v Obr. 10, několik nezávislých linií transgenního tabáku, které obsahují gen pro zralý parA1 elicitin pod kontrolou $gEAS4_{600(cyclase)}$ promotoru vykazuje zvýšenou odolnost proti onemocnění způsobenému jak rasou 0 tak rasou 1 *P. p.* var. *Nicotianae* vzhledem ke kontrolním rostlinám (tj. vzhledem k netransformovaným *N. tabacum* cv. KY160, nebo transgenním *N. tabacum* cv. KY160, obsahujícím $gEAS4_{600(cyclase)}$ promotor:GUS-reportér gen).

Zatímco zde byla detailně popsána různá provedení tohoto vynálezu je zřejmé, že se mohou u pracovníků se zkušeností v oboru vyskytnout různá pozměnění, rozšíření, přizpůsobení a optimalizace. Samo sebou se rozumí, že taková pozměnění, přizpůsobení a podobně se budou považovat za způsoby, spadající do myšlenkového rámce a rozsahu předvedeného vynálezu.

Průmyslová využitelnost

Kvalitativní a kvantitativní transkripčně-regulační sekvence funkční v rostlinách a molekuly rekombinantní DNK připravené podle vynálezu jsou použitelné pro zlepšení odolnosti transgenních rostlin vůči nemocím zejména tam, kde indukovatelný promotor řídí expresi bílkoviny, vyvolávající hypercitlivou odpověď v rostlině.

27.03.98

(2) Informace k Sekvenci č.1:
(i) Charakteristika sekvence:
(A) Délka: 512 párů bazí
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Typ řetězce: dvouvláknový
(D) Topologie: lineární
(ii) Typ molekuly: DNK
(iii) Hypotetická: ne
(iv) Anti-sense: ne
(vi) Původní zdroj:
(A) Organismus: Nicotiana tabacum
(xi) Popis sekvence: Sekvence č.1:

```
CCGCGATTGG AGGATGTTGT ACGTCGAGCT ACGCGGCACC GCGCTTAATT TTACTCGGTC    60
AAGAAGGAAC GGGGATGGTG GTCAACGAAA CACGACGGGC CCGACATCAT GCCTGACAAC   120
CCGCCGTGGG TGAAGAAGTC GACGTTGGAA AAGAGCTACA GCCTGCTCCA CGCGGATGCG   180
GGGATGGCCG CTGACTACAG AAAGTGCGTT TCCCGCCACC CGGGGCGAGC CCGGGTTTTG   240
AAGATCAATG CTGACCGAAC CAGACGGCGG TACGTCATCC GCTTGAGGGT AGAGACGGAT   300
CAGTTCTTGT TGTCGTGTGT CGAACTCGGG ACGTTTGTCA CATGGCTGGA CGGGTTATTC   360
GCCGCCATCA ACGTGTCGCC GCCAATCGAC GAGCGCGACT TTCCCAGAGA CTTTAGCGTG   420
CCACGGATCA ATTACATTAA CTAGTCTCTC ACCACTATAT ATACTTGTCC CTTCTCTTCC   480
ATTTAAGTAG AGTTCCTTTC TTTCTTCCTT AA                                 512
```

(2) Informace k Sekvenci č.2:
(i) Charakteristika sekvence:
(A) Délka: 642 párů bazí
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Typ řetězce: dvouvláknový
(D) Topologie: lineární
(ii) Typ molekuly: DNK
(iii) Hypotetická: ne
(iv) Anti-sense: ne
(vi) Původní zdroj:
(A) Organismus: Nicotiana tabacum
(xi) Popis sekvence: Sekvence č.2

```
TAGGTGAATG TCAGGGCTTA TGCTCCACGA TACTTATGCC CTGCCAGTAC ACCTCGCAGT    60
GGGACTCGCT GAAAAAACGT CTTTGTTGTG AGAAATTGCA ATTTTGAACC TCTACAATTT   120
CGACAAAACC TTGGTTCGTG AAAACTGTTT GATTAACTTT TAGACCATCC AGTCAATTTA   180
```

27.03.98

(2) Informace k Sekvenci č.5:
(i) Charakteristika sekvence:
(A) Délka: 18 párů bazí
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Typ řetězce: jednovláknový
(D) Topologie: lineární
(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina
(A) Popis: Oligonukleotidový primer pro PCR
(iii) Hypotetická: ne
(iv) Anti-sense: ano
(xi) Popis sekvence: Sekvence č.1:

ATGAGTCCTT ACATGTGA 18

(2) Informace k Sekvenci č.6:
(i) Charakteristika sekvence:
(A) Délka: 45 párů bazí
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Typ řetězce: jednovláknový
(D) Topologie: lineární
(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina
(A) Popis: Oligonukleotidový primer pro PCR
(iii) Hypotetická: ne
(iv) Anti-sense: ano
(xi) Popis sekvence: Sekvence č.6:

GGGAGCTCGA ATTCCATGGC CTCAGCAGCA GCAGTTGCAA ACTAT 45

(2) Informace k Sekvenci č.7:
(i) Charakteristika sekvence:
(A) Délka: 4253 párů bazí
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Typ řetězce: dvouvláknový
(D) Topologie: lineární
(ii) Typ molekuly: DNK
(iii) Hypotetická: ne
(iv) Anti-sense: ne
(vi) Původní zdroj:
(A) Organismus: Nicotiana tabacum

27.03.98

```
AAAAGGCTGC TAGCTAGTGT AAAGTCTAGT AAGGCAACTG GGAAATTAAA TGATTAGGTG   1080

CTTTTGATCA ATTACATTAA CTAGTCTCTC ACCACTATAT ATACTTGTCC CTTCTCTTCC   1140

ATTTAAGTAG AGTTCCTTTC TTTCTTCCTT AAAACTTAAA AGAACAAGTA AAAATACACT   1200

CATCTTTAAT TAGCA ATG GCC TCA GCA GCA GTT GCA AAC TAT GAA GAA GAG      1251
                 Met Ala Ser Ala Ala Val Ala Asn Tyr Glu Glu Glu
                  1               5                  10

ATT GTT CGC CCC GTC GCC GAC TTC TCC CCT AGT CTC TGG GGT GAT CAG      1299
Ile Val Arg Pro Val Ala Asp Phe Ser Pro Ser Leu Trp Gly Asp Gln
        15                  20                  25

TTC CTT TCA TTC TCC ATT GAT AAT CAG G TAATTTAACT AATACTAGTA          1347
Phe Leu Ser Phe Ser Ile Asp Asn Gln
    30                  35

TTCTTTATTT ATATTTATAG TTTGTTCTCC ATTGATAATC AGGTAGTTTA TTTATGTTGA   1407

ACAACATTAA TTTTGCTAAT TTCAGTTTAA TGTACATTAC ATATAG GTT GCG GAA      1462
                                                 Val Ala Glu
                                                  1

AAG TAT ATA TAT GCT CAA GAG ATT GAA GCA TTG AAG GAA CAA ACG AGG      1510
Lys Tyr Ile Tyr Ala Gln Glu Ile Glu Ala Leu Lys Glu Gln Thr Arg
    5                  10                  15

AGT ATG CTG TTA GCA ACC GGA AGG AAA TTG GCC GAT ACA TTG AAT TTG      1558
Ser Met Leu Leu Ala Thr Gly Arg Lys Leu Ala Asp Thr Leu Asn Leu
20                  25                  30                  35

ATT GAC ATT ATT GAA CGC CTT GGT ATA TCC TAC CAC TTT GAG AAA GAA      1606
Ile Asp Ile Ile Glu Arg Leu Gly Ile Ser Tyr His Phe Glu Lys Glu
                40                  45                  50

ATT GAT GAG ATT TTG GAT CAG ATT TAC AAC CAA AAC TCA AAC TGC AAT      1654
Ile Asp Glu Ile Leu Asp Gln Ile Tyr Asn Gln Asn Ser Asn Cys Asn
            55                  60                  65

GAT TTG TGC ACC TCT GCA CTT CAA TTT CGA TTG CTC AGG CAA CAC GGT      1702
Asp Leu Cys Thr Ser Ala Leu Gln Phe Arg Leu Leu Arg Gln His Gly
        70                  75                  80

TTC AAC ATC TCT CCT G GTAAGTTCAT CATGAAGTTG TTAAAATTAT              1748
Phe Asn Ile Ser Pro
    85

TATCCATTTA TTGGAAGAAG GCTAATTCAT CTTGAGTTTT CTTTCTTGAA ATACCA       1804

GAA ATT TTC AGC AAA TTC CAA GAT GAA AAT GGC AAA TTC AAG GAG TCT      1852
Glu Ile Phe Ser Lys Phe Gln Asp Glu Asn Gly Lys Phe Lys Glu Ser
 1               5                  10                  15

CTT GCT AGT GAT GTC TTA GGA TTA TTA AAC TTG TAT GAA GCT TCA CAT      1900
Leu Ala Ser Asp Val Leu Gly Leu Leu Asn Leu Tyr Glu Ala Ser His
            20                  25                  30

GTA AGG ACT CAT GCT GAC GAT ATC TTA GAA GAC GCA CTT GCT TTC TCC      1948
Val Arg Thr His Ala Asp Asp Ile Leu Glu Asp Ala Leu Ala Phe Ser
        39                  40                  45
```

27.03.98

```
AATATTTTCT AACACTTGAA CACATATATG TTTTGTATTC ACAG ATG AAA GAA GTA      2913
                                                 Met Lys Glu Val
                                                   1

GTA AGA AAT TAT AAT GTC GAG TCA ACA TGG TTT ATT GAA GGA TAT ATG      2961
Val Arg Asn Tyr Asn Val Glu Ser Thr Trp Phe Ile Glu Gly Tyr Met
  5                  10                  15                  20

CCA CCT GTT TCT GAA TAC CTA AGC AAT GCA CTA GCA ACT ACC ACA TAT      3009
Pro Pro Val Ser Glu Tyr Leu Ser Asn Ala Leu Ala Thr Thr Thr Tyr
                  25                  30                  35

TAC TAC CTC GCG ACA ACA TCG TAT TTG GGC ATG AAG TCT GCC ACG GAG      3057
Tyr Tyr Leu Ala Thr Thr Ser Tyr Leu Gly Met Lys Ser Ala Thr Glu
              40                  45                  50

CAA GAT TTT GAG TGG TTG TCA AAG AAT CCA AAA ATT CTT GAA GCT AGT      3105
Gln Asp Phe Glu Trp Leu Ser Lys Asn Pro Lys Ile Leu Glu Ala Ser
          55                  60                  65

GTA ATT ATA TGT CGA GTT ATC GAT GAC ACA GCC ACG TAC GAG G            3148
Val Ile Ile Cys Arg Val Ile Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Glu
      70                  75                  80

TATGATTTGC ATCTCAAGAA ATTATATCAT TATATGGGAT TTGGACAAAC AAAGTGTTGC    3208

GACGACAATT AAGGCAATAT AAAAGCTAAC CTTTAATTTA TCTGCTTTCT AG GTT        3263
                                                           Val
                                                            1

GAG AAA AGC AGG GGA CAA ATT GCA ACT GGA ATT GAG TGC TGC ATG AGA      3311
Glu Lys Ser Arg Gly Gln Ile Ala Thr Gly Ile Glu Cys Cys Met Arg
              5                  10                  15

GAT TAT GGT ATA TCA ACA AAA GAG GCA ATG GCT AAA TTT CAA AAT ATG      3359
Asp Tyr Gly Ile Ser Thr Lys Glu Ala Met Ala Lys Phe Gln Asn Met
          20                  25                  30

GCT GAG ACA GCA TGG AAA GAT ATT AAT GAA GGA CTT CTT AGG CCC ACT      3407
Ala Glu Thr Ala Trp Lys Asp Ile Asn Glu Gly Leu Leu Arg Pro Thr
      35                  40                  45

CCC GTC TCT ACA GAA TTT TTA ACT CCT ATT CTC AAT CTT GCT CGT ATT      3455
Pro Val Ser Thr Glu Phe Leu Thr Pro Ile Leu Asn Leu Ala Arg Ile
  50                  55                  60                  65

GTT GAG GTT ACA TAT ATA CAC AAT CTA GAT GGA TAC ACT CAT CCG GAG      3503
Val Glu Val Thr Tyr Ile His Asn Leu Asp Gly Tyr Thr His Pro Glu
                  70                  75                  80

AAA GTC TTA AAA CCT CAC ATT ATT AAC CTA CTT GTG GAC TCC ATC AAA      3551
Lys Val Leu Lys Pro His Ile Ile Asn Leu Leu Val Asp Ser Ile Lys
              85                  90                  95

ATT T GAGCTGCCAT TTGTTGCTCA TCTCAAGGAA ACTTCATTCT TCTTTGTGCA        3605
Ile

GTTGTGCAGT AGACTTCCTA ACTAGGAGCT TCTTAAGATC CTTGTAAGAA ATAATCTTCA    3665

AGTGTTATGA ATCCGCATTG TGGAGAAATC TTTTTATATG ACAATAAGTT ATGTTATGAA    3725

GAATGTTATG GGGGTCTCTT ATGACCTATT TGTCAGTGTA TGAAGTAATC TGAGCCTGTC    3785
```

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina
(A) Popis: Oligonukleotidový primer pro PCR
(iii) Hypotetická: ne
(iv) Anti-sense: ano
(xi) Popis sekvence: Sekvence č.11:

```
GCCGGATCCT TATGACTAGT TGCACCACCA CGCAGCAAAC TG                          42
```

(2) Informace k Sekvenci č.12:
(i) Charakteristika sekvence:
(A) Délka: 593 párů bazí
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Typ řetězce: dvouvláknový
(D) Topologie: lineární
(ii) Typ molekuly: DNK
(iii) Hypotetická: ne
(iv) Anti-sense: ne
(vi) Původní zdroj:
(A) Organismus: Phytophthora parasitica
(ix) Znak:
(A) Jméno/Klíč: CDS
(B) Umístění: 207..563
(xi) Popis sekvence: Sekvence č.12:

```
GTCGACGAAA GCCGAAGTGC GTGGCAGATC TTGCCGTTCG AATGCTACGC GCCACGGCAA      60

AACCTACACG GTACAACAGC TTCAAATAAA CCTGCAAGCG AGCCGCCAGC CCAACTCCAG     120

CTAGTCAAGC CTAGTTTGCC TCCAACTGCC ATTGTGCAAT TTGCTCTCAT CCACACCCAC     180

CCCACTTCTC CCCCACCTCA TCCGAA ATG AAC TTC CGC GCT CTG TTC GCC GCC       233
                             Met Asn Phe Arg Ala Leu Phe Ala Ala
                                 555                 560

ACC GTC GCC GCC CTC GTC GGC TCC ACC TCC GCC ACC ACG TGC ACC ACC       281
Thr Val Ala Ala Leu Val Gly Ser Thr Ser Ala Thr Thr Cys Thr Thr
            565                 570                 575

ACG CAG CAA ACT GCG GCG TAC GTG GCG CTC GTA AGC ATC CTC TCG GAC       329
Thr Gln Gln Thr Ala Ala Tyr Val Ala Leu Val Ser Ile Leu Ser Asp
        580                 585                 590

ACG TCG TTC AAC CAG TGC TCG ACG GAC TCT GGC TAC TCA ATG CTG ACG       377
Thr Ser Phe Asn Gln Cys Ser Thr Asp Ser Gly Tyr Ser Met Leu Thr
    595                 600                 605

GCC ACC TCG TTG CCC ACG ACG GAG CAG TAC AAG CTC ATG TGC GCG TCG       425
Ala Thr Ser Leu Pro Thr Thr Glu Gln Tyr Lys Leu Met Cys Ala Ser
610                 615                 620
```

27.03.98

(xi) Popis sekvence: Sekvence č.14:

AAGCTTTACG AATTAGATGT AAAAAGACAC AAACTACTTA TATATATTAC CAAAGTAACT 60

TGAAAGTTTA AAATTTCAAT TAGAACTATA GTAGGGTAAA ACTGTCTATT TAAAATCAGT 120

ATTTAAAAAG GCATGAGCGA AAGATGAGGC GTTTTATCTA ACACGAAGCG AGGTGTAAGC 180

CCCATGGTGT TTTATTTTTA TATTTTATAA ATTTATAAAA TCATTATATA AATCAGAAAA 240

ATACACTAAA ATTGTGAAAA GTTAAAGAAA ATTATAGAAT TAATATATAT ATATATATAT 300

ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAA ATGTATGTGT GTGTGTGTGT 360

GTATCGCATG CGCGCGACCA TGCAACTTTT TTTTCTTGAA AAAATAAAAG GCGTAAAGAT 420

ACATTATACC TATGTCATCA AAACAATATA ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT 480

ATATATATAA ATGTATGTGT GTGTGTGTGT GTATCGCATG CGCGCGACCA TGCAACTTTT 540

TTTTCTTGAA AAAATAAAAG GCGTAAAGAT ACATTATACC TATGTCATCA AAACAATATA 600

AAAACTAGAG CGATACCAAA GGAAATTTTA AATTCAAAAA CTAACTTGAA ATTAATATAT 660

TTAAAATTTC ATTTTTTTTT GTGTGGAGAA AACAAAGCAT AACACTTTGC TTTGTAACAC 720

TTTGCCTAGG TGAATGTCAG GGCTTATGCT CCACGATACT TATGCCCTGC CAGTACACCT 780

CGCAGTGGGA CTCGCTGAAA AAACGTCTTT GTTGTGAGAA ATTGCAATTT TGAACCTCTA 840

CAATTTCGAC AAAACCTTGG TTCGTGAAAA CTGTTTGATT AACTTTTAGA CCATCCAGTC 900

AATTTAACTC TAAACTGACC TAAATAAATA CTACGTACAC TAGTCTTTAA GTTCATCAAA 960

GTGGACTCTG CATTAATAAT TGAAATTTAT GCCGCAACAA TGACATTAGG TTTTATAAAT 1020

AAAGTAATAG GAATTTGATA GTTCCAGGAA ACAACTCTAC AGTACTCCCT TATTTTGTGC 1080

CTTTTTAAAT AATATTATTC AGTTGACGAA ACAAATAAAT AAAATATTTG GGAAACTGGA 1140

TCAATAGACC CCAGACGCCA ACAATGAATC AAAAGGCTGC TAGCTAGTGT AAAGTCTAGT 1200

AAGGCAACTG GGAAATTAAA TGATTAGGTG CTTTTGATCA ATTACATTAA CTAGTCTCTC 1260

ACCACTATAT ATACTTGTCC CTTCTCTTCC ATTTAAGTAG AGTTCCTTTC TTTCTTCCTT 1320

AAAACTTAAA AGAACAAGTA AAAATACACT CATCTTTAAT TAGCAATG 1368

PV 3656-97
27.09.98



# PATENTOVÉ NÁROKY

1. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny obsahující indukovatelný regulační element odolnosti proti rostlinnému onemocnění.

2. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 1, kde regulační element je získán z genu kódujícího terpen cyklázu.

3. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 2, kde terpen cykláza je seskviterpen cykláza.

4. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 3, kde regulační element řídí expresi epi-5-aristolochen syntetázy.

5. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 4, molekula nukleové kyseliny obsahující nukleotidovou sekvenci uvedenou v Obr. 3A (Sekvence č. 14) nebo indukovatelný fragment odolnosti proti rostlinnému onemocnění z ní.

6. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 5, kde rekombinantní molekula nukleové kyseliny má nukleotidovou sekvenci uvedenou v Obr. 3A (Sekvence č. 14).

7. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 5, kde rekombinantní molekula nukleové kyseliny obsahuje nukleotidy 463 až 473 ze Sekvence č. 2.

8. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 5, kde rekombinantní molekula nukleové kyseliny obsahuje nukleotidy 406 až 486 ze Sekvence č. 2.

9. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 5, kde rekombinantní molekula nukleové kyseliny obsahuje nukleotidy 463 až 572 ze Sekvence č. 2.

10. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 5, kde rekombinantní molekula nukleové kyseliny obsahuje nukleotidy 371 až 463 ze Sekvence č. 2.

27.03.98

11. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 5, kde rekombinantní molekula nukleové kyseliny obsahuje nukleotidy 411 až 457 ze Sekvence č. 2.

12. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 1, kde rekombinantní molekula nukleové kyseliny je získána z dvouděložné rostliny.

13. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 12, kde dvouděložná rostlina je člen *Solanaceae*.

14. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 13, kde člen *Solanaceae* je člen rodu *Nicotiana*.

15. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 1, kde rekombinantní molekula nukleové kyseliny je získána z jednoděložné rostliny.

16. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 1, kde rekombinantní molekula nukleové kyseliny je získána z nahosemenné rostliny.

17. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 1, kde rekombinantní molekula nukleové kyseliny je získána z jehličnanu.

18. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 1, kde rekombinantní molekula nukleové kyseliny je genomová DNK.

19. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 1, kde rekombinantní molekula nukleové kyseliny je chemicky syntetizovaná DNK.

20. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 1, kde rekombinantní molekula nukleové kyseliny je kombinace genomové DNK a chemicky syntetizovaná DNK.

27.03.98

21. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 1, kde rekombinantní molekula nukleové kyseliny je kombinace genomové DNK a cDNK nebo kombinace genomové DNK, cDNK a chemicky syntetizovaná DNK.

22. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 1, kde indukce je zprostředkována rostlinným patogenem.

23. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 22, kde rostlinný patogen je houba.

24. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 23, kde houbový patogen je člen rodu *Phytophthora*.

25. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 22, kde indukce je zprostředkována bakteriálním patogenem.

26. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 25, kde bakteriální patogen je člen rodu *Pseudomonas.*

27. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 22, kde indukce je zprostředkována virovým patogenem.

28. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 27, kde virový patogen je virus tabákové mozaiky.

29. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 1, kde indukce je zprostředkována elicitorem.

30. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 29, kde indukce je zprostředkována houbovým elicitorem.

31. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 29, kde indukce je zprostředkována bakteriálním elicitorem.

27.03.98

32. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 1, kde rekombinantní molekula nukleové kyseliny je operačně připojena k nukleotidovým sekvencím kódujícím heterologní polypeptid.

33. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 32, kde heterologní polypeptid je schopen propůjčit rostlině odolnost proti nemoci.

34. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 33, kde heterologní polypeptid je elicitin.

35. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 33, kde elicitin je houhový elicitin.

36. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 35, houhový elicitin je z *Phytophthora*.

37. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 36, elicitin obsahující ParA1 polypeptid.

38. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 33, kde elicitin je bakteriální elicitin.

39. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 38, kde bakteriální elicitin je heparin.

40. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 32, kde indukce je zprostředkována jedním nebo více vnějšími činiteli.

41. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 32, kde rekombinantní molekula nukleové kyseliny je schopna exprimovat heterologní polypeptid buněčně specifickým způsobem.

27.03.98

42. Rekombinantní molekula nukleové kyseliny podle nároku 32, kde heterologní polypeptid je farmaceutický protein.

43. Vektor obsahující DNK podle nároku 1.

44. Vektor podle nároku 43, schopný indukovatelné regulace exprese nukleotidové sekvence v buňkách obsahujících vektor.

45. Vektor podle nároku 44, nukleotidová sekvence kódující heterologní polypeptid.

46. Transgenní rostlina obsahující rekombinantní molekulu nukleové kyseliny podle nároku 1 integrovanou do genomu rostliny.

47. Transgenní rostlina obsahující rekombinantní molekulu nukleové kyseliny podle nároku 32 integrovanou do genomu rostliny.

48. Semeno z transgenní rostliny podle nároku 46.

49. Semeno z transgenní rostliny podle nároku 47.

50. Buňka z transgenní rostliny podle nároku 46.

51. Buňka z transgenní rostliny podle nároku 47.

52. Způsob poskytnutí odolnosti proti nemoci transgenní rostlině, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kroky:

(a) vytvoření transgenní rostlinné buňky obsahující rekombinantní molekulu nukleové kyseliny podle nároku 32 integrovanou do genomu transgenní rostlinné buňky; a

(b) vypěstování transgenní rostliny z transgenní rostlinné buňky kde exprese rekombinantní molekuly nukleové kyseliny podle nároku 32 propůjčuje transgenní rostlině odolnost proti nemoci.

27.03.98

53. Transgenní rostlina podle nároku 52, kde transgenní rostlina je dvouděložná.

54. Transgenní rostlina podle nároku 53, kde dvouděložná rostlina je člen *Solanaceae*.

55. Transgenní rostlina podle nároku 54, kde člen *Solanaceae* je člen rodu *Nicotiana*.

56. Transgenní rostlina podle nároku 52, kde transgenní rostlina je jednoděložná rostlina.

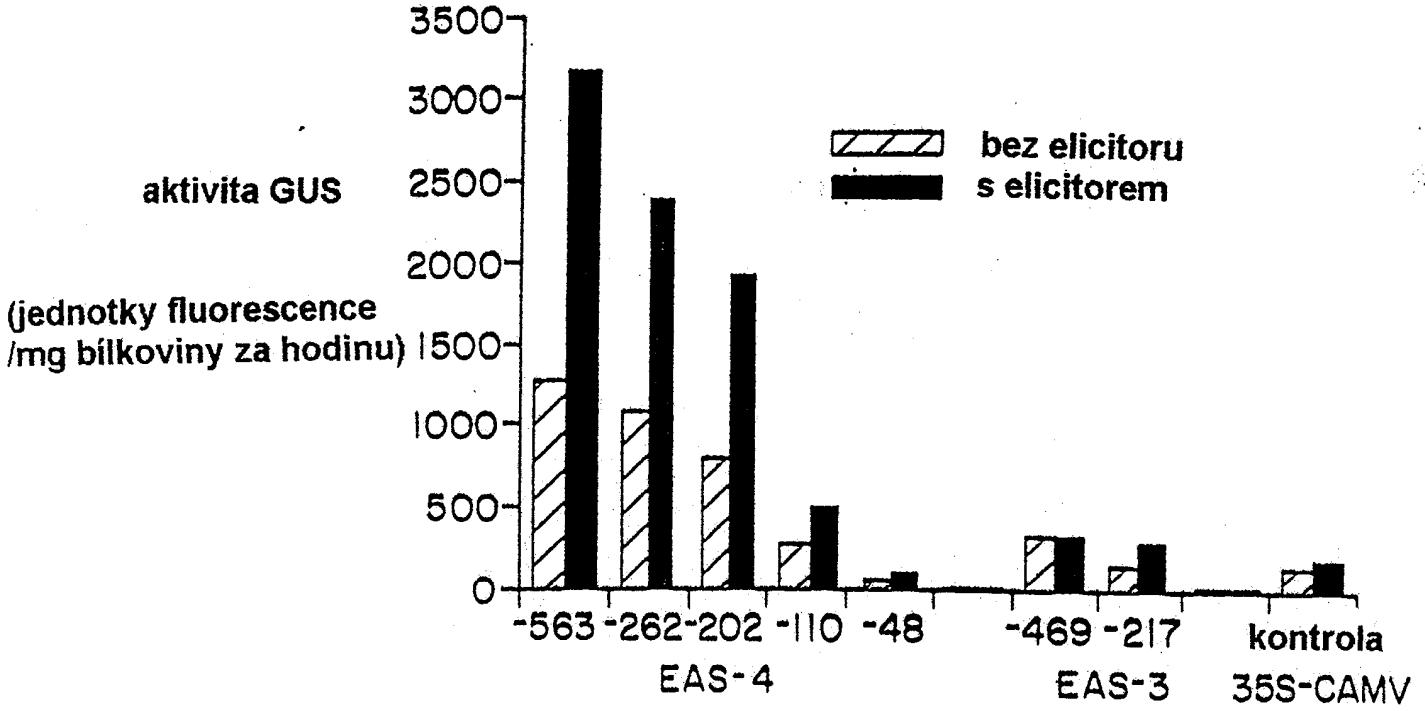
57. Transgenní rostlina podle nároku 52, kde transgenní rostlina je nahosemenná rostlina.

58. Transgenní rostlina podle nároku 52, kde transgenní rostlina je jehličnan.

59. Způsob zvýšení transkripční exprese sekvencí DNK umístěných ve směru transkripce v transgenních rostlinných buňkách, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kroky:

(a) vytvoření transgenní rostlinné buňky obsahující rekombinantní molekulu nukleové kyseliny podle nároku 1, umístěnou kvůli zvýšení transkripce DNK sekvencí ve směru transkripce a integrovanou do genomu transgenní rostlinné buňky;

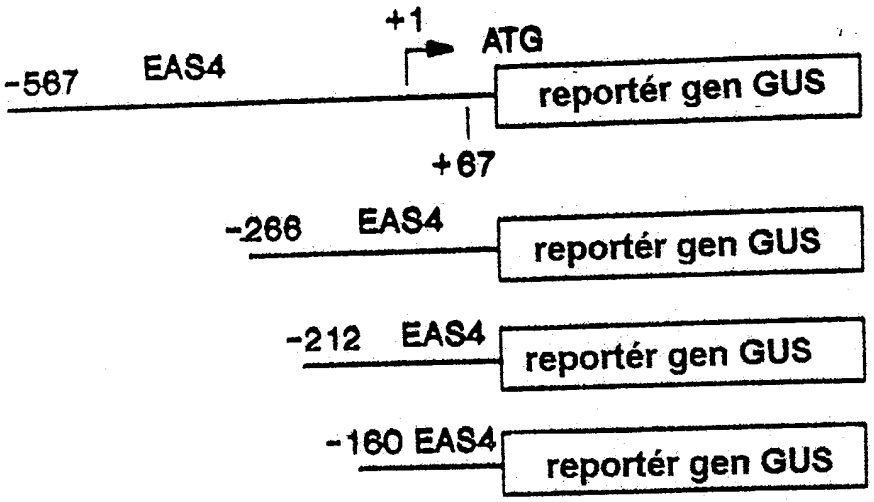
(b) vypěstování transgenní rostliny z rostlinné buňky.




**Obr. 1**



PV 2656-94

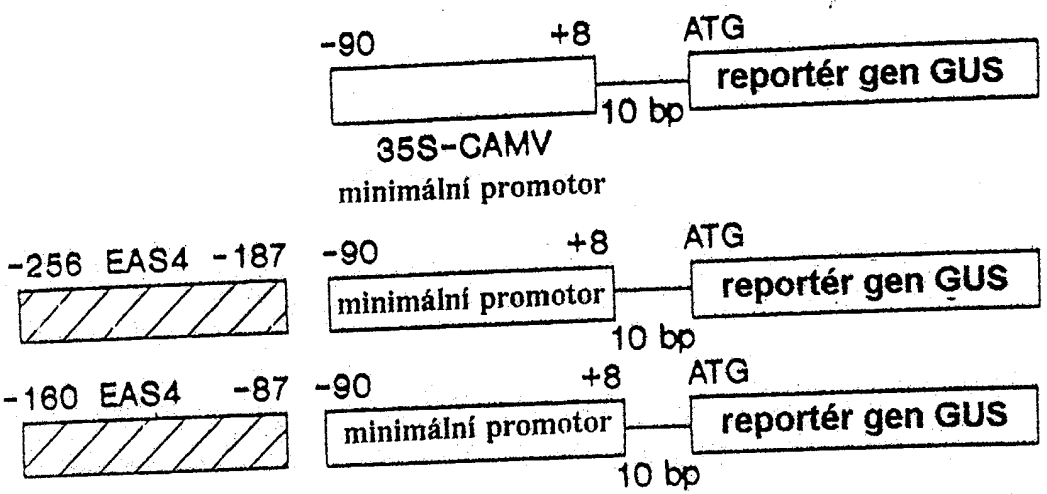



| | exprese GUS | |
|---|---|---|
| | kontrola | indukováno |
| | aktivita GUS (jednotky fluorescence/ mg bílkoviny hod) | |
| -567 EAS4 reportér gen GUS | 234 | 1803 |
| -266 EAS4 reportér gen GUS | Neměřeno | Neměřeno |
| -212 EAS4 reportér gen GUS | 65 | 492 |
| -160 EAS4 reportér gen GUS | 23 | 256 |

**Obr. 2A**



PV 3656-97




| | exprese GUS | |
|---|---|---|
| | kontrola | indukováno |
| | aktivita GUS (jednotky fluorescence/ mg bílkoviny hod) | |
| | 14 | 14 |
| | 10 | 14 |
| | 12 | 527 |

**Obr. 2B**



PV 3656-94

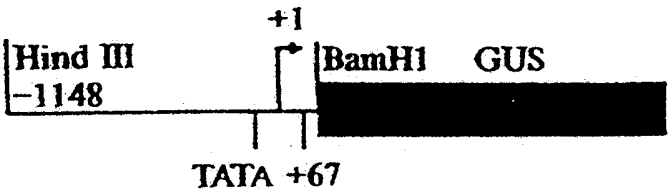
PV 3656-97
27.03.98



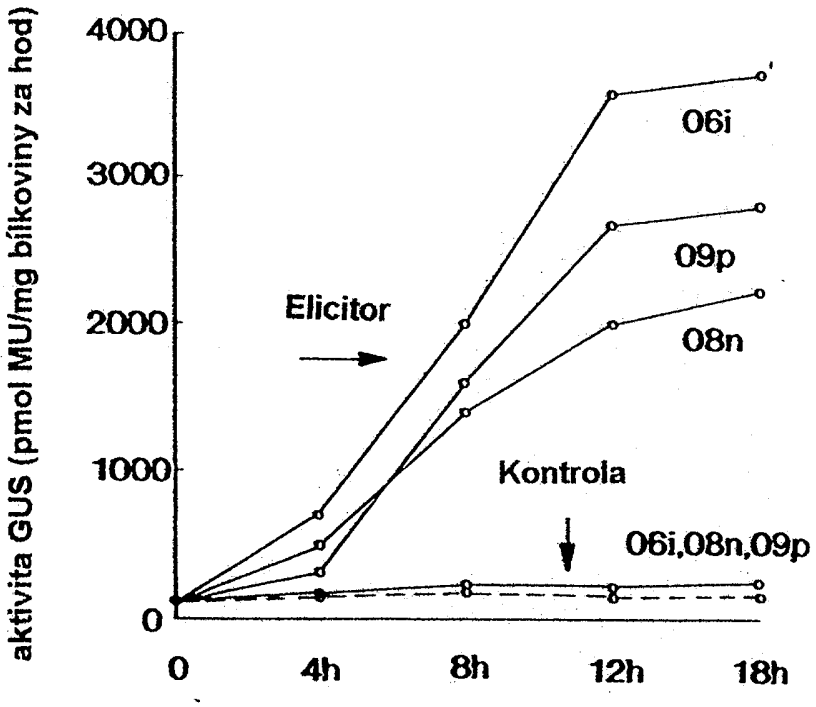
−1148

AAGCTTTACGAATTAGATGTAAAAAGACACAAACTACTTATATATATTAC
CAAAGTAACTTGAAAGTTTAAAATTTCAATTAGAACTATAGTAGGGTAAA
ACTGTCTATTTAAAATCAGTATTTAAAAAGGCATGAGCGAAAGATGAGGC
GTTTTATCTAACACGAAGCGAGGTGTAAGCCCCATGGTGTTTTATTTTTA
TATTTTATAAATTTATAAAATCATTATATAAATCAGAAAAATACACTAAA
ATTGTGAAAAGTTAAAGAAAATTATAGAATTAATATATATATATATATAT
ATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAAATGTATGTGT
GTGTGTGTGTGTATCGCATGCGCGCGACCATGCAACTTTTTTTTCTTGAA
AAAATAAAAGGCGTAAAGATACATTATACCTATGTCATCAAAACAATATA
AAAACTAGAGCGATACCAAAGGAAATTTTAAATTCAAAAACTAACTTGAA
ATTAATATATTTAAAATTTCATTTTTTTTTGTGTGGAGAAAACAAAGCAT
AACACTTTGCTTTGTAACACTTTGCCTAGGTGAATGTCAGGGCTTATGCT
CCACGATACTTATGCCCTGCCAGTACACCTCGCAGTGGGACTCGCTGAAA
AAACGTCTTTGTTGTGAGAAATTGCAATTTTGAACCTCTACAATTTCGAC
AAAACCTTGGTTCGTGAAAACTGTTTGATTAACTTTTAGACCATCCAGTC
AATTTAACTCTAAACTGACCTAAATAAATACTACGTACACTAGTCTTTAA
GTTCATCAAAGTGGACTCTGCATTAATAATTGAAATTTATGCCGCAACAA
TGACATTAGGTTTTATAAATAAAGTAATAGGAATTTGATAGTTCCAGGAA
ACAACTCTACAGTACTCCCTTATTTTGTGCCTTTTTAAATAATATTATTC
AGTTGACGAAACAAATAAATAAAATATTTGGGAAACTGGATCAATAGACC
CCAGACGCCAACAATGAATCAAAAGGCTGCTAGCTAGTGTAAAGTCTAGT
AAGGCAACTGGGAAATTAAATGATTAGGTGCTTTTGATCAATTACATTAA
CTAGTCTCTCACCACTATATATACTTGTCCCTTCTCTTCCATTTAAGTA[+1]G
AGTTCCTTTCTTTCTTCCTTAAAACTTAAAAGAACAAGTAAAAATACACT
CATCTTTAATTAGCA
+67

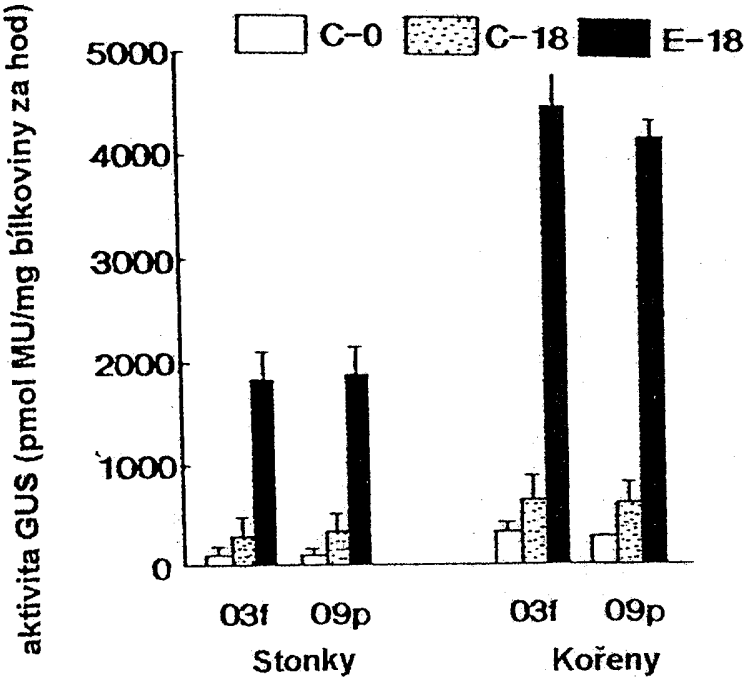
**Obr. 3A**



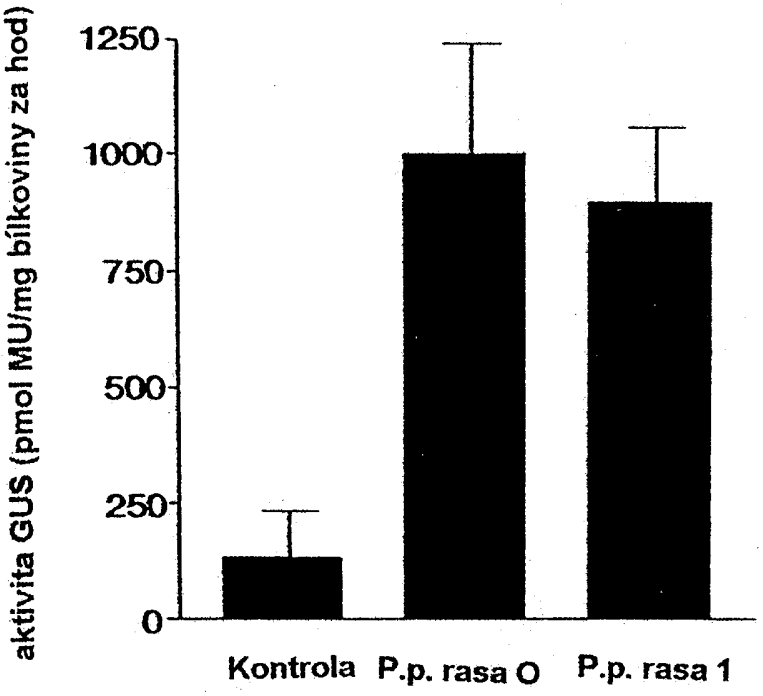

**Obr. 3B**


aktivita GUS (pmol MU/mg bílkoviny za hod)
4000
3000
2000
1000
0
0
4h
8h
12h
18h
Elicitor
06i
09p
08n
Kontrola
06i,08n,09p

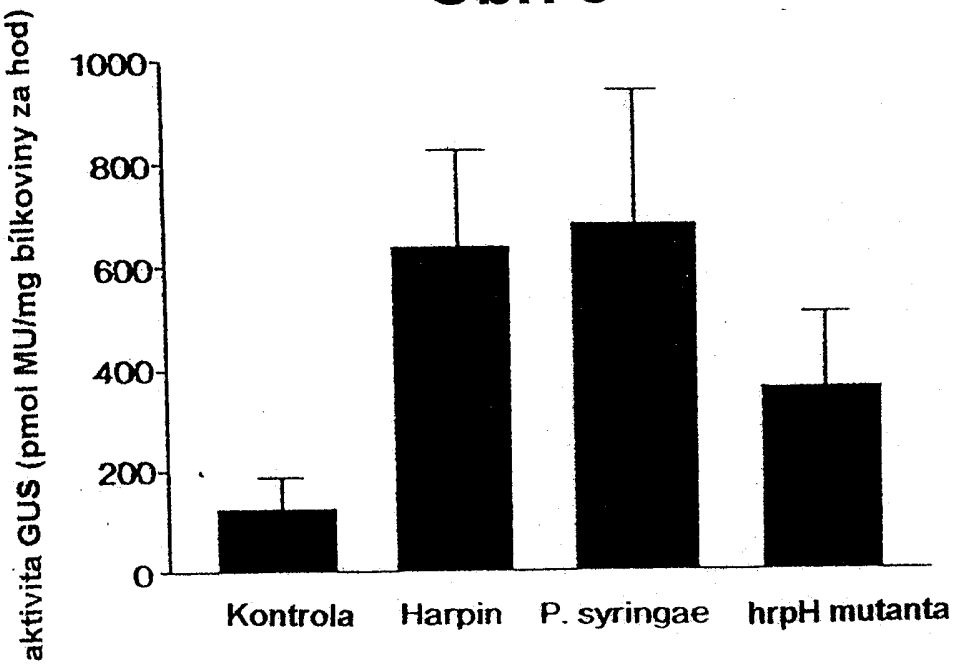
Obr. 4A


aktivita GUS (pmol MU/mg bílkoviny za hod)
C-0
C-18
E-18
5000
4000
3000
2000
1000
0
03f
09p
03f
09p
Stonky
Kořeny

Obr. 4B


aktivita GUS (pmol MU/mg bílkoviny za hod)
1250
1000
750
500
250
0
Kontrola
P.p. rasa O
P.p. rasa 1

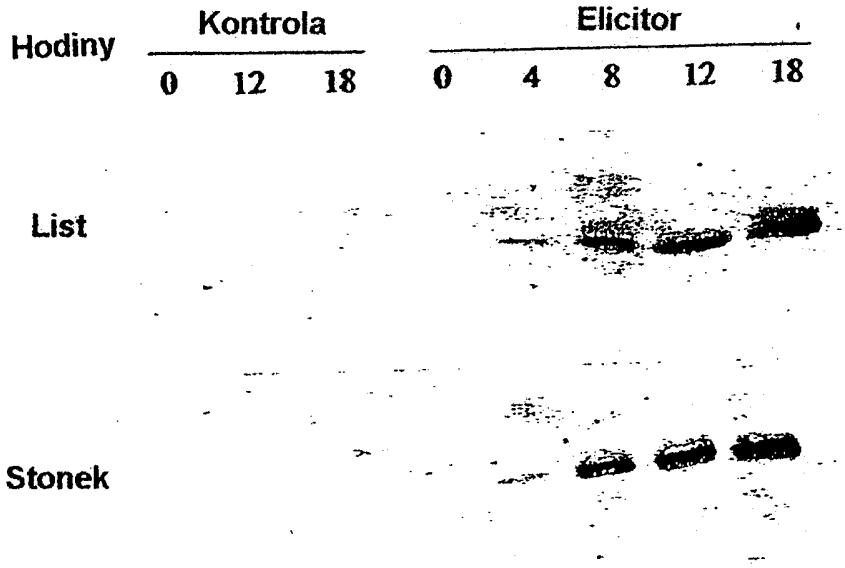
Obr. 5


aktivita GUS (pmol MU/mg bílkoviny za hod)
1000
800
600
400
200
0
Kontrola
Harpin
P. syringae
hrpH mutanta

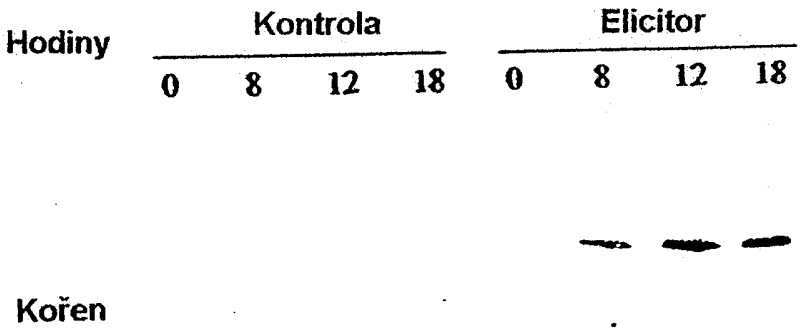
Obr. 6

PV 3656-97
27.03.98

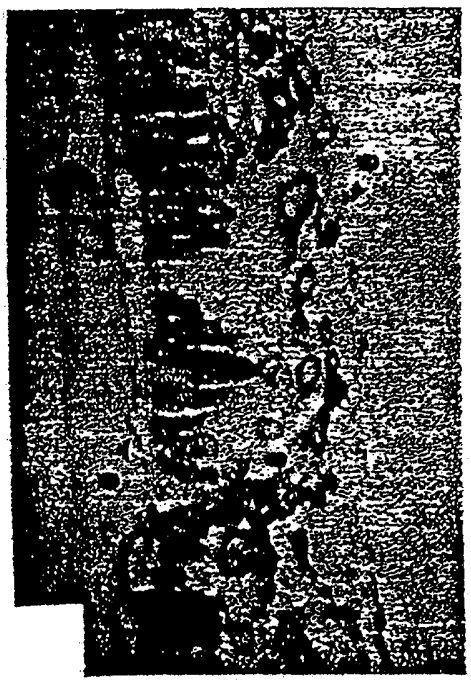




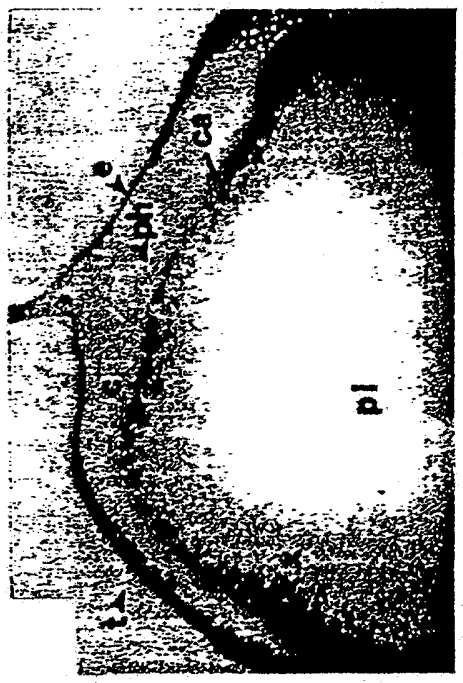

Obr. 7A




Obr. 7B



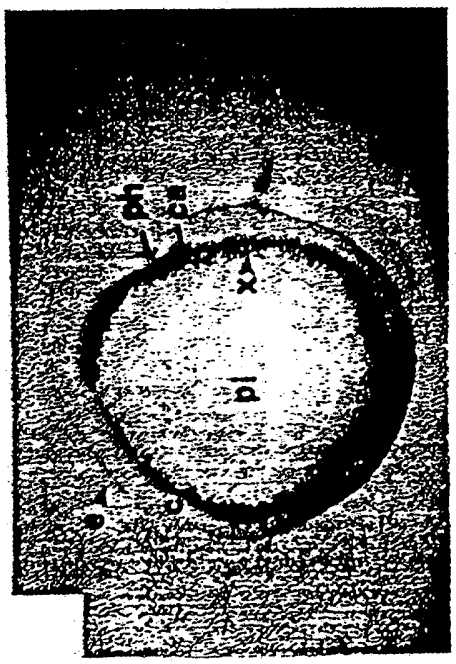
Obr. 8B



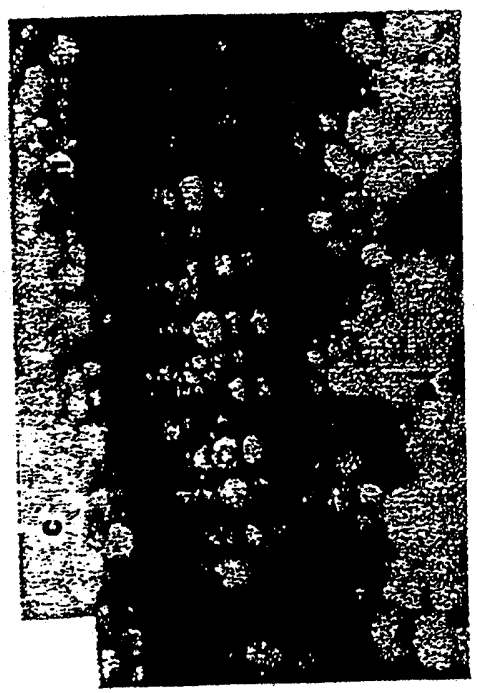

Obr. 8D



Obr. 8A



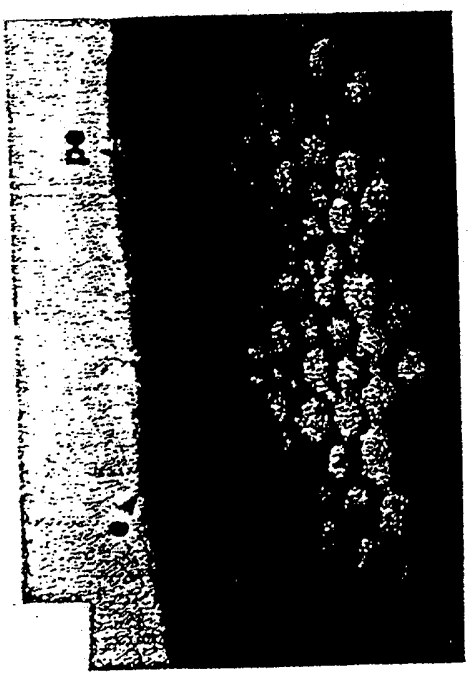

Obr. 8C



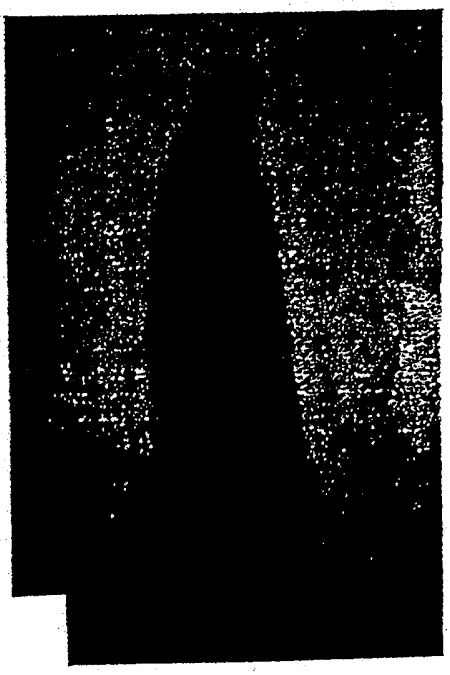
Obr. 8F



Obr. 8H



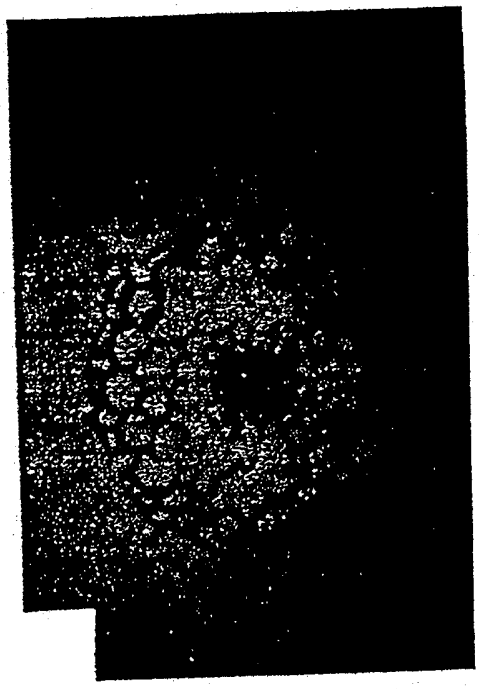
Obr. 8E



Obr. 8G



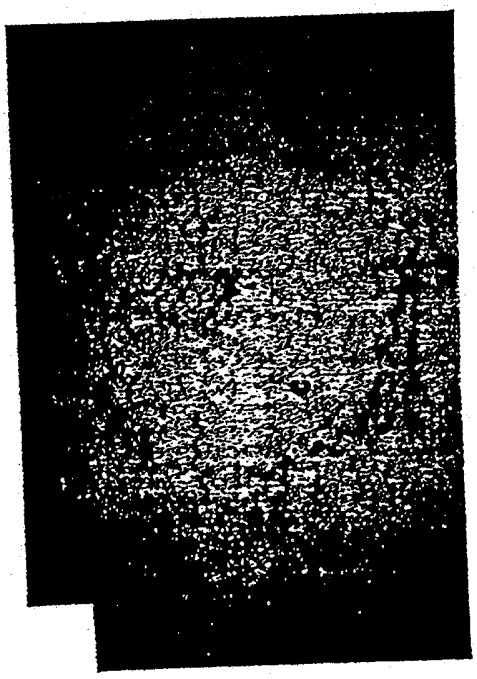
Obr. 8J



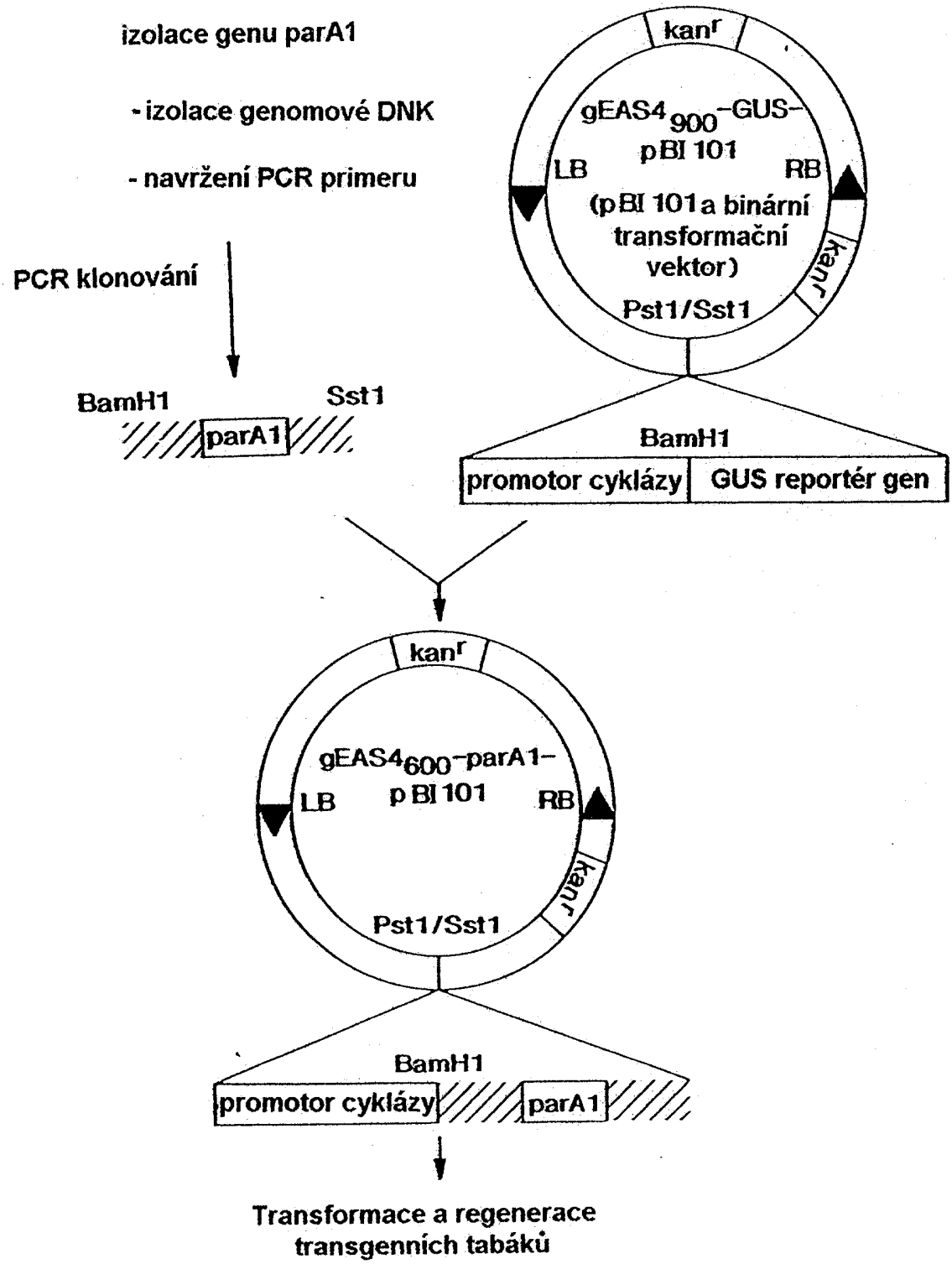
Obr. 8L



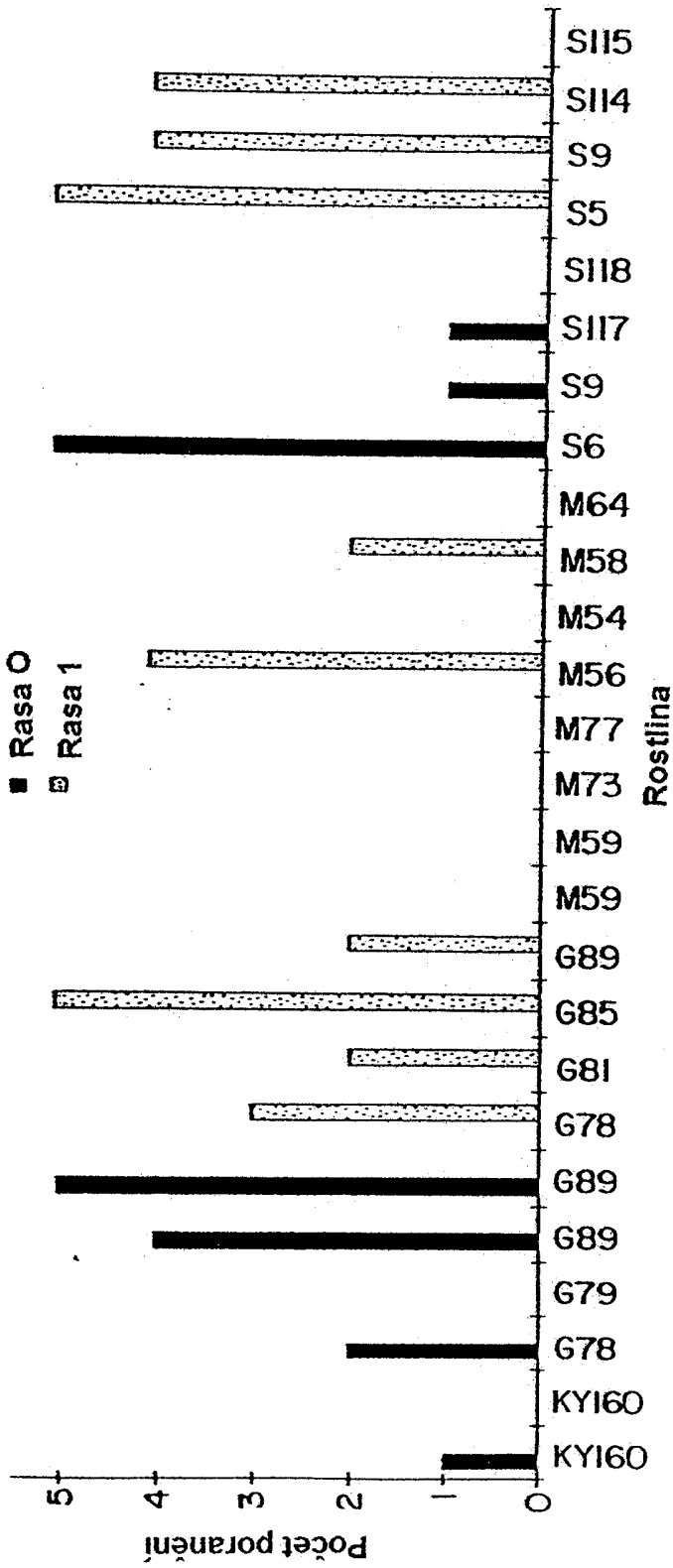
Obr. 8I



Obr. 8K


izolace genu parA1
- izolace genomové DNK
- navržení PCR primeru
PCR klonování
BamH1
Sst1
parA1
kan^r
gEAS4 900 -GUS-
pBI 101
LB
RB
(pBI 101 a binární transformační vektor)
Pst1/Sst1
kanr
BamH1
promotor cyklázy
GUS reportér gen
kan^r
gEAS4600-parA1-
pBI 101
LB
RB
kanr
Pst1/Sst1
BamH1
promotor cyklázy
parA1
Transformace a regenerace transgenních tabáků

**Obr. 9**


SII5
SII4
S9
S5
SII8
SII7
S9
S6
M64
M58
M54
M56
M77
M73
M59
M59
G89
G85
G81
G78
G89
G89
G79
G78
KYI60
KYI60
Rasa 0
Rasa 1
Rostlina
Počet poranění
5
4
3
2
1
0

Obr. 10