

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

294 329

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. : ⁷

C 12 N 15/82

C 12 N 15/54

A 01 H 5/00

A 01 N 3/00

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLového
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1996-3782**
(22) Přihlášeno: **29.06.1995**
(30) Právo přednosti: **29.06.1994 FI 1994/943133**
(40) Zveřejněno: **18.03.1998**
(**Věstník č. 03/1998**)
(47) Uděleno: **30.09.04**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **15.12.2004**
(**Věstník č. 12/2004**)
(86) PCT číslo: **PCT/FI1995/000377**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1996/000789**

(73) Majitel patentu:

BTG INTERNATIONAL LIMITED, London, GB

(72) Původce:

Londesborough John, Helsinki, FI
Tunnela Outi, Espoo, FI
Holmström Kjell-Ove, Uppsala, SE
Mäntylä Einar, Uppsala, SE
Welin Björn, Uppsala, SE
Mandal Abul, Uppsala, SE
Palva Tapio E., Uppsala, SE

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1273, Praha 4,
14021

(54) Název vynálezu:

Rostlina transformovaná kódující sekvencí genu
Saccharomyces cerevisiae

(57) Anotace:

Rostlina transformovaná kódující sekvencí genu
Saccharomyces cerevisiae pro trehalóza-6-fosfátsyntázu, který
je pod kontrolou nekonstitutivního rostlinného promotoru,
přičemž transformovaná rostlina má kapacitu pro syntézu
trehalózy větší než je kapacita netransformované rostliny.
Řešení lze použít pro ochranu běžných kulturních rostlin proti
suchu, vysokému obsahu solí a teplotním extrémům, a pro
zlepšení skladovacích vlastností sklizených rostlin,
zahrnujících "zelené" potraviny, trhané ovoce a okrasné
rostliny.

CZ 294329 B6

Rostlina transformovaná kódující sekvencí genu *Saccharomyces cerevisiae*

Oblast techniky

Vynález se týká genetického inženýrství rostlin s cílem zavést schopnost syntetizovat trehalózu. Konkrétně se vynález týká rostlin, které mají zvýšený obsah trehalózy, a způsobu, jak je připravit. Vynález se rovněž týká způsobů jak navodit zvýšení tolerance rostlin ke stresům, jako například chladu a suchu, i způsobu jak navodit produkci trehalózy.

Dosavadní stav techniky

Trehalóza (α -glukopyranosyl- α -D-glukopyranóza) je dimer glukózových molekul, spojených přes jejich redukující skupiny. Vzhledem k neobvyklé kombinaci svých chemických vlastností ve srovnání s jinými cukry, včetně nedostatku redukujících skupin, pomalé hydrolýzy a schopnosti vytvářet nerozpustné „sklo“, se jedná o jednu z nejužitečnějších látek používaných pro ochranu bílkovin, buněčných membrán a jiných biologických látek *in vitro*. Podobně pro žijící organizmy, které obsahují velká množství trehalózy je charakteristické, že jsou často vystaveny osmotickému, dehydratačnímu a tepelnému stresu. Jedná se o hmyz, některé litorální živočichy a řadu mikroorganismů, včetně kvasinek a bakterií. Existuje podrobný důkaz, který shrnul Wiemken v roce 1990 v časopise *Antonie van Leeuwenhoek* 58, 209–217, že primární rolí trehalózy v pekařských kvasinkách je navozovat odolnost k těmto stresům. Předpokládá se však rovněž (Nwaka *et al.* (1994) *FEBS Letters* 344, 225–228; Van Dijk *et al.* (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 109–115), že akumulace trehalózy v pekařských kvasinkách sama o sobě není dostatečná k navození tolerance ke stresu.

Vysoké hladiny trehalózy se vyskytují v takzvaných „resurrection plants“, jako například u kapradiny *Selaginella lepidophylla*, která jsou schopné přežít dlouhodobé vysušení a vystavení vysokým teplotám (viz shrnující článek Avigadův (1982) v *Encyclopedia of Plant Research* (New Series) 13 A, str. 217–347). Velká většina cévnatých rostlin však není schopna syntetizovat trehalózu. Tyto rostliny často akumulují jiné „kompatibilní“ rozpuštěné látky, jako je glycin betain, prolin a různé polyoly, v odpovědi na stres způsobený například suchem, které snižují dostupnost intracelulární vody (viz shrnující článek McCue a Hansona (1990) *Trends in Biotechnology* 8, 358–362).

Existuje velmi málo údajů o přítomnosti trehalózy u krytosemenných rostlin, a většinou se jedná o malá množství, která pravděpodobně odrážejí mikrobiální kontaminaci (např. Kandler a Senger (1965) *Z. Pflanzenphysiol.* 53, 157–161; Oesch a Meier (1967) *Phytochemistry* 6, 1147–1148). Opravdu byl vysloven názor, že trehalóza je toxická pro mnoho rostlinných tkání (Veluthambi *et al.* (1981) *Plant Physiol.* 68, 1369–1374), zejména pro ty, které mají nízkou nebo nulovou aktivitu trehalózy (trehalóza je enzym, který převádí trehalózu na glukózu). Avšak alespoň jedna krytosemenná rostlina, *Myrothamnus flabellifolia* (další z takzvaných „resurrection plants“), akumuluje značná množství trehalózy (Bianchi *et al.* (1993) *Physiologia Plantarum* 87, 223–226), což ukazuje na to, že neexistuje absolutní kompatibilní bariéra mezi trehalózou a krytosemennými rostlinami.

Nepřítomnost trehalózy u většiny krytosemenných rostlin a zmíněná toxicita zjištěná u některých z nich ukazuje, že po zavedení syntetické dráhy pro trehalózu do těchto rostlin lze v některých případech očekávat negativní účinky. Na druhé straně, úspěšná produkce trehalózy v rostlinách by představovala podstatnou výhodu. Trehalózou akumulovanou například v zásobních orgánech cukrovky, bramboru, cibule a podobně, by bylo možné extrahovat na komerční bázi a tak získat trehalózu při nákladech, které by byly kompetitivní ve srovnání se sacharózou v určitých aplikacích. Takové aplikace zahrnují výrobu sušených potravin (práškové mléko a vejce, polévky, ovocné pyré, atd.), protože trehalóza chrání vůni a strukturu mnoha potravinových produktů

v průběhu ekonomicky výhodných sušících postupů, a v tomto ohledu vysoce překonává obdobný efekt sacharózy (viz např. Roser (1991) Trends in Food Science and Technology, July, str. 166–169; Roser a Colaco (1993) New Scientist, May, str. 25–28). V porovnání se sacharózou je další výhodou trehalózy v mnoha případech (polévky, prášková vejce) skutečnost, že není sladká, a dále i to, že z ní nevzniká fruktóza, která je považována za riskantní pro lidské zdraví. Vysoká cena trehalózy však činí její využití v průmyslové výrobě sušených potravin příliš nákladným. Za druhé, produkce trehalózy v jedlých částech určitých rostlin by vedla k prodloužení skladovatelnosti produktů, jako jsou například rajčata. Za třetí, hromadění trehalózy v citlivých tkáních zvyšuje toleranci rostlin k mrazu, suchu, vysokému obsahu soli a podobným stresům.

Podstata vynálezu

Na základě toho, co je uvedeno výše, je předmětem vynálezu poskytnutí nové schopnosti rostlinám syntetizovat trehalózu. Konkrétně je předmětem vynálezu poskytnutí schopnosti řízení akumulovat trehalózu v rostlinných tkáních, jako komerčním zdroji trehalózy, nebo pro navození tolerance ke stresu, nebo za obojím účelem, a přitom minimalizovat potenciálně nepříznivé vlivy trehalózy na růst rostlin.

Vynález je založen na způsobu transformace rostlin strukturálními geny pro syntézu trehalózy, které jsou pod kontrolou vhodných rostlinných promotorů, s cílem produkce transgenních rostlin se zvýšeným obsahem trehalózy. Konkrétně se jedná o to, že kódující sekvence jednoho nebo několika genů kódujících polypeptidy enzymů produkujících trehalóza-6-fosfát nebo samotnou trehalózu, jsou podle vynálezu exprimovány v rostlinách pod kontrolou specifických rostlinných promotorů.

Rostlina transformovaná kódující sekvencí genu *Saccharomyces cerevisiae* pro trehalóza-6-fosfátsyntázu, který je pod kontrolou nekonstitutivního rostlinného promotoru, má kapacitu pro syntézu trehalózy větší než je kapacita netransformované rostliny.

Tedy daná rostlina je transformována alespoň kódující sekvencí genu pro trehalóza-6-fosfátsyntázu (Tre6Psyntáza) vhodně fúzovanou s rostlinným promotorem takovým způsobem, že k plné expresi genu dochází pouze když rostlina dozrává, nebo když se setká se specifickými podmínkami prostředí. Promotory jsou proto s výhodou nekonstitutivní a vybrané tak, aby dovolily dočasnou (např. diurnální), topologickou (např. tkáňově specifickou), nebo stresem aktivovanou (nebo „stresem indukovanou“) kontrolu exprese genů. Rostlinu lze rovněž transformovat jedním nebo několika geny kódujícími trehalóza-6-fosfatázu (Tre6Pázu) nebo regulačním polypeptidem, který interaguje s Tre6Psyntázou nebo Tre6Pázou nebo oběma.

Transformaci rostliny lze provést kterýmkoli ze způsobů dostupných v oboru, včetně infekce transformovaným *Agrobacter tumefaciens* a přímou introdukcí cizorodé DNA mikroinjekcí, elektroporací, bombardováním částicemi a přímým transportem DNA. Strukturální geny jsou výhodně zvoleny ze skupiny zahrnující kvasinkové geny TPS1, TPS2, a TSL1, které kódují Tre6Psyntázu o molekulové hmotnosti 56 kDa, Tre6Pázu o hmotnosti 102 kDa a regulační subjednotky kvasinkové trehalosyntázy o molekulové hmotnosti 123 kDa.

Dalším předmětem vynálezu je poskytnout způsob produkce transgenních rostlin se zvýšeným obsahem trehalózy. Tento způsob zahrnuje kroky transformace dané rostliny strukturálními geny pro syntézu trehalózy, zejména genem pro Tre6Psyntázu, jak je uvedeno výše, a exprese těchto genů pod kontrolou vhodného promotoru, který umožní dočasnou, topologickou nebo stresem indukovanou kontrolu exprese uvedených genů.

Třetím předmětem vynálezu je produkce trehalózy, která zahrnuje kroky:

– transformaci rostliny alespoň jedním strukturálním genem pro Tre6Psyntázu s cílem vzniku transgenní rostliny,

– kultivaci transgenní rostliny za podmínek, které budou indukovat expresi syntézy trehalózy v rostlině, a

– extrakci trehalózy z rostlinných tkání.

Čtvrtým předmětem vynálezu je poskytnutí způsobu ochrany rostlin proti nepříznivým podmínkám jako jsou sucho, vysoký obsah soli, teplotní extrémy a jiné stresy. Tento způsob zahrnuje transformaci rostliny alespoň kódovací sekvencí genu pro trehalóza-6-fosfátsyntázu, která je vhodně fúzovaná s rostlinným promotorem, takže plná exprese genu se neuskuteční, dokud se rostlina nesetká s nepříznivými podmínkami. Rostlinu lze výhodně současně transformovat jedním nebo několika geny kódujícími trehalóza-6-fosfatázu a regulační proteiny, které stabilizují aktivitu trehalóza-6-fosfát-syntázy nebo trehalóza-6-fosfatázy nebo obou. Například, vynález poskytuje způsob ochrany rostlin majících bobule nebo jiné plody proti poškození květů mrazem, což je umožněno transformací rostliny genem pro trehalóza-6-fosfatázu, který je vhodně fúzovaný s rostlinným promotorem, takže k plné expresi genu nedojde, pokud se rostlina nedostane do nízké teploty.

Pátým předmětem vynálezu je poskytnutí způsobu produkce transformovaných okrasných rostlin, které nevyžadují tak intenzivní a odbornou péči jako netransformované rostliny. Tento způsob zahrnuje transformaci rostliny genem pro trehalóza-6-fosfátsyntázu, který je vhodně fúzován s rostlinným promotorem, takže rostlina obsahuje trehalózu v některých svých tkáních.

Krátký popis obrázků

Obr. 1. ukazuje schematicky strukturu chimérického genového produktu, obsahujícího malý subjednotkový promotor Rubisco *A. thaliana* (pasts1A), zfúzovaný s kvasinkovým genem TPS1, který kóduje subjednotku Tre6-Psyntázy a stop signál transkripce z genu pro nopalinsyntázu *Agrobacterium tumefaciens* (nos). Je ukázána pouze část plazmidu pKOH51 s genovou chimérou. Jsou ukázána unikátní místa pro štěpení restrikčními enzymy významná pro konstrukci genové chiméry.

Obr. 2. uvádí výsledky Western blot analýzy transgenních rostlin tabáku, které ukazují TPS1 produkt o molekulové hmotnosti 56 kDa. Produkt je označen šipkou. Proteiny byly extrahovány z transformovaných rostlin tabáku, obsahujících (dráhy 1, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 15, 16 a 19) konstrukt popsáný na obr. 1 nebo (GUS) další genovou chiméru, obsahující promotor mozaikového viru kvěťáku o molekulové hmotnosti 35S, zfúzovaný s genem pro β -glukuronidázu (UIDA) ve stejném vektoru nebo (SR1) z netransformovaných rostlin tabáku. Stejná množství proteinu byla nanášena do každé z drah. Použité antisérum (anti-57) bylo připraveno proti subjednotce kvasinkové Tre6Psyntázy o molekulové hmotnosti 56 kDa.

Obr. 3. ukazuje chromatografickou identifikaci trehalózy. Vzorky (20 l) vodných extraktů tabákových listů byly analyzovány pomocí HPLC tak, jak je popsáno v Obecném materiálu a metodách. Extrakty A a B obsahovaly 192 mg čerstvé hmotnosti transformantu rostoucího ve skleníku v 19 ml (A) před a (B) po působení trehalózy. Extrakty C a D obsahovaly 149 mg listové hmoty na ml z (C) transformanta 4 nebo (D) kontrolní rostliny transformované plazmidem pDE1001, který neobsahoval gen TPS1. Obě rostliny byly kultivovány za sterilních podmínek. Maxima trehalózy jsou označena T. Dvě velká maxima s retenčním časem okolo 25 minut (maxima 7 a 8 v A) jsou glukóza a sacharóza.

Obr. 4. Záznam proteinové imunoblotovací techniky ukazující tkáňovou lokalizaci TPS1-subjednotky analyzované u *ats1-TPS1* transformované linie 4. Listy divokého tabáku (SR1) byly použity jako negativní kontrola a 0,1 g Tre6Psyntázové subjednotky purifikované z kvasinky (TPS1) jako pozitivní kontrola. Trehalózový obsah stejných tkání je uveden v mg/g suché hmotnosti nad imunoblotovým záznamem. Zkratka nt znamená netestováno. Dále jsou použity následující zkratky: FB, květní pupeny; UL, horní listy; ML, střední listy; LL, spodní listy; US, horní stonek; R, kořeny; EC, enzymová kontrola.

Obr. 5. Zvýšená tolerance k suchu v rostlinách produkujících trehalózu. Oddělené listy ze stejného vývojového stadia rostlin starých 6 až 8 týdnů, které byly kultivovány *in vitro*, byly sušeny na vzduchu (25 % RH). (A) V časech, které jsou uvedeny, byly listy váženy a výsledky uvedeny jako relativní čerstvá hmotnost listů v každém čase. Suchá hmotnost každého listu byla získána po sušení listů při +60 °C po dobu 48 hodin. Kontrola s divokým typem tabáku je označena SR1 a trehalózu produkující transgenní linie 1, 4 a 8 jsou označeny jejich odpovídajícími čísly. (B) Vzhled oddělených listů transgenní linie 4 a kontrolních rostlin ve vybraných časech během působení stresu.

Obr. 6. Přežívání kontrolních a trehalózu produkujících tabákových rostlin za podmínek sucha. (A) 6 až 8 týdnů staré intaktní rostliny pěstované *in vitro* byly vystaveny sušení vzduchem (D) po doby, vyznačené v grafu. Po 17 hodinách působení stresu byly netransformované kontrolní rostliny (SR1) a trehalózu produkující transgenní rostliny linií 4 a 8 rehydratovány (R) tím, že rostliny byly umístěny do vody. (B) 3 týdny staré rostliny transgenní linie 8 a jak netransformované (SE1) tak vektorem transformované (C) kontrolní rostliny byly vystaveny sušení vzduchem (D) po indikovaný čas. Rostlinky byly následně rehydratovány (R) po 7 hodinách působení stresu tím, že byly umístěny do vody.

Obr. 7. SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti sodium dodecyl-sulfátu), analýza frakcí obsahujících Tre6Psyntázu *M. smegmatis* eluovanou z prvního Heparin-Sepharózového sloupce. Dráhy 1 až 4 obsahují popořadě vzorky H33 (7,0 mU), H35 (20 mU), H36 (21 mU) a 37 H37 (12 mU) (Tab. 3). Po provedení SDS-PAGE v 8% akrylamidu byly geny obarveny pomocí Coomassie Brilliant Blue. Velikosti standardů molekulové hmotnosti v dráze 5 jsou uvedeny v kDa. Poloha polypeptidu Tre6Psyntázy o molekulové hmotnosti 55 kDa je označena šipkou.

Obr. 8. SDS-PAGE analýza frakce z oblasti maxima Tre6Psyntázy *M. smegmatis* eluované z druhého Heparin-Sepharózového sloupce. Frakce T21 (Tab. 3) byla koncentrována ve zkumavce Centricon 10 a následně smíšena s polovinou objemu třikrát koncentrovaného pufru, používaného pro vzorky při SDS-PAGE. Celková koncentrace byla šestinásobná. Vzorky obsahující (dráha 1) 2,9 mU a (dráha 3) 8,7 mU Tre6Psyntázy byly analyzovány SDS-PAGE v 8% akrylamidu a obarveny pomocí Coomassie Brilliant Blue. Standardy molekulárních hmotností v dráze 2, seřazené podle velikosti, byly 109, 84, 47, 33, 24 a 16 kDa.

Obr. 9. Western analýza Tre6Psyntázy purifikované z *M. smegmatis*. Na 8% akrylamidový gel byly nanášeny předem obarvené markery molekulové hmotnosti (dráha 1: 200, 117, 80 a 47 kDa; dráha 10: jediný viditelný marker má 84 kDa), čistá Tre6Psyntáza z frakce T21 (Tab. 3) (dráhy 7 a 8: 2,9 mU; dráhy 3, 4 a 9: 8,7 mU) a spojené aktivní frakce ze Sephadexu G100 (Tab. 3) (dráha 6: 7,8 g celkového proteinu; dráhy 2 a 5: 23 g celkového proteinu). Po provedení elektroforézy a přenosu na nitrocelulózu byla nitrocelulózová membrána rozstřížena mezi dráhami 3 a 4 a mezi dráhami 7 a 8. Dráhy 1 až 3 byly obarveny pomocí Coomassie Brilliant Blue, detekce na dráhách 4 až 7 byla provedena anti-57 sérem, které bylo získáno imunizací proti purifikované subjednotce kvasinkové Tre6Psyntázy, mající molekulovou hmotnost 56 kDa, a detekce na dráhách 8 až 10 byla provedena pomocí preimunního séra. Imunoreaktivní pásy byly zviditelněny použitím kozího, antikráličího IgG-alkalická fosfatáza konjugátu (Promega) podle instrukcí výrobce. V obou případech byly časy vybarvení 2,8 minut. Diagonální čáry napříč dráhám 4 až 7 byly způsobeny náhodným zvarhaněním membrány během přenosu na nitrocelulózu.

- Obr. 10. Western analýza 8 transgenních linií *Arabidopsis thaliana*. Rostliny vypěstované ze semen primárních transformantů byly extrahovány a analyzovány pomocí antiséra, připraveného proti subjednotce kvasinkové Tre6Psyntázy, mající molekulovou hmotnost 56 kDa, tak jak je popsáno na obr. 2. Subjednotka Tre6Psyntázy purifikovaná z kvasinky (0,1 g) byla použita jako pozitivní kontrola. Netransformovaná *A. thaliana* nedává žádný signál.

Podrobný popis vynálezu

- V následujícím popisu výraz „konstitutivní rostlinný promotor“ označuje rostlinné promotory, které vyvolávají kontinuální a obecnou expresi s nimi asociovaných kódujících sekvencí, takže produkty těchto sekvencí jsou nalézány ve všech buňkách rostliny a ve všech fázích růstu. Nekonstitutivní promotory naproti tomu jsou aktivovány specifickými vnitřními nebo vnějšími událostmi, jako například diferenciací buněk, které vyúsťují v tvorbu zvláštních tkání v průběhu vývoje a zrání rostliny, nebo změnami v prostředí rostliny. Je známo mnoho typů změn prostředí, které aktivují zvláštní promotory. Příklady zahrnují světlem indukovanou aktivaci promotorů pro malou subjednotku ribulóza-1,5-bisfosfátkarboxylázy (Krebbes *et al.* (1988) Plant. Mol. Biol. 11, 745–759), jako například promotor ast1A, použitý v příkladech 1 až 3, a aktivaci promotorů různými stresy, jako například LTI78 (Nordin *et al.* (1993) Plant. Mol. Biol. 21, 641–653) a RAB18 (Lang a Palva (1992) Plant. Mol. Biol. 20, 951–962). Avšak náš vynález není omezen těmito příklady nekonstitutivních promotorů. Důležitou a novou částí vynálezu je koncept, že konstitutivní syntéza trehalózy rostlinou bude vždy neekonomická a někdy působící negativně, takže výhody produkce trehalózy popisované v této patentové přihlášce lze nejlépe uskutečnit pomocí nekonstitutivních promotorů. Díky těmto nekonstitutivním promotorům je biosyntéza trehalózy v transgenních rostlinách podřízena dočasné kontrole (tj. probíhá pouze v určitou dobu), topologické kontrole (tj. je omezena pouze na určité části rostliny), nebo oběma typům kontrol zároveň.
- Názvy rostlinných orgánů použité v tomto popisu jsou obecně používány v zelinářských a ovocnářských kruzích jak pěstiteli, tak i zákazníci. Takto například slovo „plod“ představuje ty části jabloně nebo jahodníku, které jsou prodávány za účelem jídla, ačkoli tyto skladované tkáně obsahující semena samy o sobě nejsou plody v přísném botanickém smyslu slova. Zmínili jsme již, že téměř všechny druhy cévnatých rostlin nejsou schopny syntetizovat trehalózu, takže termín „trehalózu produkující“ rostliny nevyžaduje kvantitativní definici. Avšak možnost, že některé běžné rostliny (jiné než takzvané „resurrection plants“) produkují trehalózu během stresu, dosud nebyla prozkoumána. Tento vynález se týká genetického inženýrství rostlin s cílem vnést heterologní schopnost syntézy trehalózy (v tomto kontextu ji lze rovněž nazývat „nová“ schopnost syntézy trehalózy). Požadovaný vzrůst obsahu trehalózy, ve srovnání s netransformovanou rostlinou, která roste za identických podmínek, buď představuje užitečné zlepšení tolerance ke stresu nebo jej lze využít pro extrakci trehalózy z rostliny za komerčním účelem.

- Mnoho mikrobiálních organizmů obsahuje enzymové systémy, které produkují trehalóza-6-fosfát (Tre6P) a hydrolyzují tuto látku na trehalózu. Například *Saccharomyces cerevisiae* obsahuje trehalózsyntázový komplex zahrnující subjednotky o molekulové hmotnosti 56, 102 a 123 kDa (Londesborough a Vucro (1993) Eur. J. Biochem. 216, 841–848), který kondenzuje uridindifosfoglukózu (UDPG) a glukóza-6-fosfát (Glc6P) nejprve na Tre6P (Tre6Psyntázová reakce) a potom na volnou trehalózu (Tre6Pázová reakce). Za Tre6Psyntázovou a Tre6Pázovou aktivitu jsou zodpovědné subjednotky o 56 a 102 kDa a subjednotka mající molekulovou hmotnost 123 kDa má regulační vlastnosti a stabilizuje celý komplex. Jiné mikrobiální systémy zahrnují systém *Candida utilis* (Soler *et al.* (1989) FEMS Microbiol. Letters 61, 273–278), *Escherichia coli* (Glaever *et al.* (1988) J. Bacteriol. 170, 2841–2849), *Dictyostelium discoideum* (Killick (1979) Arch. Biochem. Biophys. 196, 121–123) a *Mycobacterium smegmatis* (Lapp *et al.* (1971) J. Biol. Chem. 246, 4567–4579), z nichž poslední dva systémy jsou schopny využívat adenindifosfoglukózu (ADPG) jako alternativu k UDPG. Málo je známo o subjednotkové struktuře těchto

dalších mikrobiálních systémů. Mnohobuněčné organizmy, které syntetizují trehalózu, jako jsou Nematoda, hmyz a tzv. „resurrection plants“, pravděpodobně též obsahují enzymy mající Tre6Psyntázovou a Tre6Pázovou aktivitu.

- 5 V principu přenos kterékoli z těchto Tre6Psyntáz do rostlin udělí rostlinám novou schopnost syntetizovat Tre6P. Bylo zjištěno, že některé rostliny, jako například tabák, mají vrozenou schopnost převádět Tre6P na trehalózu, takže, překvapivě například, transformace tabáku samotným genem pro Tre6Psyntázu, vede k účinné produkci trehalózy. Avšak, jestliže je endogenní konverze Tre6P na trehalózu pomalá nebo vůbec neprobíhá, lze rovněž přenést Tre6Pázu z některého z vhodných zdrojů. Systémy jako je kvasinkový enzym, kde Tre6Psyntáza a Tre6Páza jsou subjednotky trehalózasyntázy, je výhodné kotransformovat rostliny geny pro Tre6Psyntázu a Tre6Pázu ze stejného zdroje, takže se vytvoří přirozený komplex enzymů. Ať je zdroj enzymů jakýkoli, lze trehalózu vytvářenou v transgenních rostlinách extrahovat anebo tento cukr nám navodí zvýšenou toleranci k určitým typům stresu. Produkce trehalózy v rostlinách transformovaných tímto způsobem určitými kvasinkovými geny již byla popsána (PCT/FI93/00049).

- Avšak ačkoli akumulace trehalózy v určitém čase (např. během vystavení stresu nebo ve zralé rostlině) a v určitých tkáních (např. zásobních orgánech nebo, ve vhodném čase, ve tkáních citlivých k mrazu) bude mít pravděpodobně pozitivní účinek, nebo alespoň nebude pro rostlinu škodlivá, existuje reálná možnost, že v jiném čase a v jiných tkáních bude akumulace trehalózy pro rostlinu škodlivá (Veluthambi *et al.* (1971) *loc. cit.*). Je proto výhodné používat rostlinný promotor (promotor je část genu, která stimuluje transkripci kódující sekvence), který nedovoluje plnou expresi genu nebo genů, a vyvolá syntézu trehalózy až když rostlina je zralá, nebo se dostane do podmínek prostředí (jako je sucho nebo nízká teplota), kdy výhody přítomnosti trehalózy převýší její možné nevýhody pro rostlinu. V oboru je známo několik příkladů takových nekonstitutivních rostlinných promotorů, včetně promotoru malé subjednotky ribulóza-1,5-bis-fosfátkarboxylázy (Rubisco), který umožňuje světlem indukovanou expresi malé subjednotky RUBISCA (Krebbers *et al.* (1988) *Plant Mol. Biol.* 11, 745–759).

- 30 Tabák a rostliny *Arabidopsis* transformované kódující sekvencí (otevřený čtecí rámec, ORF) kvasinkového genu TPS1, správně fúzanou s promotorem *ats1A* genu pro malou subjednotku Rubisco, jsou známy. TPS1 kóduje subjednotku kvasinkové trehalózasyntázy mající molekulovou hmotnost 56 kDa. Transformované rostliny jsou zdravé a fertillní, a obsahují ve svých listech trehalózu. Netransformovaný tabák nebo tabák transformovaný podobným vektorem bez genu TPS1 neobsahuje trehalózu. Tyto zveřejněné transgenní rostliny byly získány s použitím *A. tumefaciens*, který zprostředkoval transformaci, ale lze použít kterýkoli způsob dostupný v oboru, včetně přímé introdukce DNA mikroinjekcí, elektroporací nebo bombardování částicemi (Gasser a Fraley (1989) *Science* 244, 1293).

- 40 Jedna z těchto transformovaných tabákových rostlin (transformant 4) obsahuje aktivitu Tre6Psyntázy. Volná, 56 kDa těžká subjednotka je nestabilní, jestliže ji izolujeme z intaktního kvasinkového komplexu trehalózasyntázy (Londesborough a Vuorio (1993) *loc. cit.*). Jsou popsány způsoby, jimiž odborník dokáže kontrtransformovat rostliny TPS1 genem a jedním nebo oběma ostatními geny kvasinkové trehalózasyntázy (TPS2 a TLS1), a umístit je pod kontrolu rostlinných promotorů, např. promotoru *ats1A* nebo některého vhodného promotoru, který je konstitutivní. Taková kotransformace často zvýší obsah trehalózy v rostlině ve srovnání s obsahem trehalózy rostlin obsahujících pouze TPS1, protože subjednotky kódované TPS2 a TLS1 stabilizují subjednotku mající molekulovou hmotnost 56 kDa.

- 50 V rostlinách kontrtransformovaných genem pro Tre6Psyntázu (kontrolovaným indukovatelným promotorem) spolu s jedním nebo několika geny pro Tre6Pázu nebo regulačními proteiny (jako například produkt TLS1), regulovanými konstitutivními promotory, bude produkce trehalózy kontrolována indukovatelným promotorem, protože Tre6Psyntáza katalyzuje první jedinečný krok biosyntézy trehalózy.

Bylo prokázáno, že transformované rostliny tabáku produkující trehalózu vykazují zvýšenou toleranci k suchu. Bylo to dokázáno v experimentech, prováděných jak s oddělenými listy, tak i s celými rostlinami. Zlepšená tolerance k suchu je vykazována zralými rostlinami i mladými
 5 rostlinkami potomstva transformantů získaného samosprášením. V tomto potomstvu tolerance suchu kosegregovala se znakem TPS1, jak ukázala přítomnost subjednotky Tre6Psyntázy, mající molekulovou hmotnost 52 kDa, v zelených tkáních potomstva.

10 Tolerance k vodou vyvolanému stresu u uvedených transgenních rostlin je překvapující, protože množství trehalózy zjištěné v jejich tkáních se zdá být příliš malé, aby zajistilo osmotické pufování vnitrobuněčného obsahu. Je možné, že trehalóza funguje tak, že chrání specifická místa, jako jsou membrány, nebo trehalóza či její prekurzor (Tre6P) mění rostlinný metabolismus tak, že vyvolávají sekundární změny, které chrání buňky proti stresu.

15 Bylo zjištěno, že malé morfologické změny pozorované u primárních transformantů obsahujících genovou chiméru TPS1 genu, jako jsou například listy ve tvaru skalpelu, snížená apikální dominance nebo menší výška, většinou zmizely u potomstva, které ještě produkovalo trehalózu. Tyto alterace se zdají být většinou artefakty vyvolané kultivací ve formě tkáňových kultur. Avšak bylo zjištěno, že trehalózu produkující tabákové rostliny, včetně potomstva získaného samosprášením,
 20 rostou poněkud pomaleji, neboť se opoždějí za kontrolními rostlinami o 1 až 2 týdny po 8-týdenním růstu za optimálních podmínek. Tato skutečnost ukazuje na to, že syntéza trehalózy v rostlinách, i když je pod kontrolou ats1A promotoru, někdy zpomaluje růst. Tedy stresem indukované promotory, jako je LT178 (Nordin *et al.* (1993) Plant. Mol. Biol. 21, 641–653), lze použít v pozitivním smyslu k udržení normálních růstových rychlostí a výtěžků za podmínek nepřítomnosti stresu, a tyto promotory současně poskytují trehalózou indukovanou ochranu
 25 v přítomnosti stresu, tak jak je vysvětleno v příkladu 5.

Tyto transgenní rostliny syntetizovaly trehalózu, ačkoli byly transformovány pouze kvasinkovým genem TPS1, kódujícím Tre6Psyntázu a nikoli genem TPS2, který kóduje Tre6Pázu. Tedy
 30 některé rostliny mají endogenní aktivitu převádějící Tre6P na trehalózu. V některých případech je výhodné kotransformovat rovněž rostlinu genem kódujícím Tre6Pázu, jako je například TPS2, aby se zvýšila rychlost konverze Tre6P na trehalózu. Dále je zřejmé, že podobné výsledky lze dosáhnout s geny pro Tre6Psyntázu (a Tre6Pázu), získanými z jiných organismů než z kvasinek. Řada těchto genů je homologních s TPS1 (a TPS2), a lze je snadno klonovat s použitím
 35 imunologických nebo oligonukleotidových prób, odvozených od enzymů a genů kvasinkového systému. Například Tre6Psyntáza *Mycobacterium smegmatis* obsahuje 56 kDa těžký polypeptid, který křížově reaguje s antisérem připraveným proti purifikované subjednotce kvasinkové Tre6Psyntázy o molekulové hmotnosti 56 kDa. Aminokyselinové sekvence tryptických peptidů z enzymu *M. smegmatis* jsou známy a mají blízkou sekvenční homologii s kvasinkovým
 40 enzymem. Odborník dokáže snadno klonovat geny pro Tre6Psyntázu a Tre6Pázu z mnoha organismů, jestliže použije uvedené přístupy. Náš vynález se týká transformace rostlin geny pro Tre6Psyntázu a Tre6Pázu, získanými z jakéhokoli vhodného organismu a fúzovanými s vhodnými rostlinnými promotory.

45 Rostliny obsahující trehalózu jako výsledek transformace jedním nebo několika geny pro trehalózasyntázu, lze použít několika způsoby. Například trehalózu lze extrahovat z rostlin na komerční bázi. Tato trehalóza je dostatečně levná pro použití ve velkém množství pro zachování chuti, vůně a struktury látek v potravinách během sušení. Pro tento způsob použití je lépe, jestliže je trehalóza akumulována v zásobním orgánu, jako je například hlíza bramboru, kořen cukrové
 50 a jiné řepy, nebo cibule cibulovitých rostlin. Byly popsány způsoby pro transformaci těchto uvedených a mnoha jiných plodin (Lindsey (1992) J. Biotechnol. 26, 1–28), avšak náš vynález není omezen těmito rostlinami, které jsou často používány jako modely molekulární biologie. Způsoby vyvinuté pro modelové rostliny lze upravit pro použití s jinými rostlinami. V důsledku toho lze tuto patentovou přihlášku použít například pro stonky a listy transformované cukrové
 55 řepy, nebo plod banánu. V oboru jsou známy rostlinné promotory (např. patatinový promotor),

5 které vyvolávají specificky expresi v zásobním orgánu. V jednom provedení tohoto vynálezu je kódující sekvence genu pro Tre6Psyntázu (např. TPS1) zřezována s takovým promotorem stejným způsobem, jako byla kódující sekvence TPS1 zřezována s promotorem *ats1*, a vhodné rostliny jsou transformovány těmito konstrukty DNA. Trehalózu, která se akumuluje v zásobních orgánech lze potom extrahovat.

10 V dalším provedení tohoto vynálezu, kdy se trehalóza akumuluje v tkáních rostliny, dochází ke zlepšení skladovacích vlastností po sklizni. V důsledku toho ztrácí oddělené listy transformovaného tabáku vodu pomaleji než listy tabáku netransformovaného, a i po ztrátě vody neztrácí barvu (obr. 5). Tento aspekt lze využít i u jedlých a okrasných rostlin. U rostlin používaných jako potrava například zkroucení a odbarvení různých druhů komerčně prodávaných salátů které nastává po sklizení rostlin, představuje závažný ekonomický problém, zejména v prodejnách maloobchodu. Konečné náklady však vždy platí zákazník.

15 Trehalózu produkující hlávkový salát (*locika*) zajistí zákazníkům levnější a lepší saláty. Podobně lze uvažovat i o jiných druzích rostlin, které se používají v kuchyni, zejména se to týká zeleniny, kde se v kuchyni používají listy, jako například zelí, brokolice, špenát, kopr nebo petržel, anebo ostatní zelená zelenina jako hrášek a fazol šarlatový. Řada okrasných květín, například růže, tulipány a narcisy, jsou po uříznutí dopravovány dále. I v podmínkách nákladné dopravy
20 v chladicích vozech nebo letadly dochází k velkým ztrátám na zboží. Opět náklady za tyto škody zaplatí zákazník, který v případě využití okrasných květín produkujících trehalózu získá levnější a krásnější produkty, které lépe zadržují svůj obsah vody a méně podléhají odbarvování. V tomto případě, týkajícím se našeho vynálezu, je gen pro Tre6Psyntázu zřezován s rostlinným promotorem, který je zvolen tak, že se trehalóza akumuluje v rostlinných částech, které se mají sklízet.
25 Například promotor *ats1A* vyvolává expresi Tre6Psyntázy v listech, horním stonku a květních pupenech tabáku a trehalóza se akumuluje v těchto částech. Avšak vynálezci uvádějí ve známost, že rostliny jako tabák přenášejí trehalózu z místa její syntézy do tkání, které tento cukr nesyntetizují. Takto byla malá množství trehalózy rovněž nalezena v kořenech těchto transgenních rostlin tabáku, ačkoli nekonstitutivní promotor *ast1A* nevyvolal expresi Tre6Psyntázy v kořenech.
30

V aspektu vynálezu, který má vztah k tomu, co je uvedeno výše, jsou jedlé části transformovaných rostlin, obsahujících trehalózu, jako například rajčata, bobule a jiné plody, zpracovávány na pyré, pasty, želé a zavařeniny, které mají čerstvější a bohatší vůni a chuť, díky tomu, že
35 obsahují trehalózu. Bylo zjištěno (WO 89/00012), že přidání trehalózy do takových potravinových produktů zlepšuje zachování jejich chuti a vůně, zejména, jestliže zpracování zahrnuje sušení. Tento vynález obchází potřebu přidávat trehalózu tím, že dává k dispozici rostlinu, která již sama trehalózu obsahuje. Výhodou z hlediska tohoto aspektu našeho vynálezu je použití promotorů takových jako je například patatinový promotor, které směřují syntézu trehalózy
40 primárně do zásobního orgánu cílové rostliny.

Bylo ukázáno, že transformovaný tabák, který produkuje trehalózu, má zvýšenou odolnost proti suchu. Obecně jsou transformované rostliny obsahující trehalózu odolnější vůči suchu, mrazu, vysokému obsahu soli a jiným stresům, v porovnání s netransformovanými rostlinami. Sucho,
45 mráz a osmotický stres negativně ovlivňují rostliny zejména tím, že odnímají vodu z buněk a tím poškozuji membrány a proteiny. Tento efekt je v podmínkách *in vitro* zmírněn trehalózou (Crowe *et al.* (1992) *Annu. Rev. Physiol.* 54, 579). V tomto aspektu vynálezu je použitý rostlinný promotor takový, který je indukován stresem. V oboru jsou takové promotory známy, například LTI78 (Nordin *et al.* (1993) *Plant. Mol. Biol.* 21, 641–653) a RAB18 (Lang a Palva (1992) *Plant. Mol. Biol.* 20, 951–962). Takový promotor zabrání syntéze trehalózy pokud tato není potřeba.
50 Pro rostliny, které rostou dobře jestliže obsahují trehalózu, tohoto aspektu vynálezu lze dosáhnout, aniž bychom se uchýlili k použití stresem indukovaného promotoru. Avšak použití stresem indukovaných promotorů k zabránění produkce trehalózy, pokud ji není třeba, má další výhody v tom, že se vyhneme sníženému výtěžku rostliny, vyplývajícimu z částečného využití
55 kapacity fotosyntézy na syntézu trehalózy, a tím i možnému zpomalení růstu, tak jak bylo

- ukázáno pro tabák obsahující chiméru pats1A-TPS1. Tento aspekt má použití nejen v oblasti rostlin, používaných jako potrava, nýbrž i v případě okrasných rostlin, používaných v zahradě nebo v místnostech. Transformované, ke stresu tolerantní okrasné rostliny vyžadují méně intenzivní a méně odbornou péči ve srovnání s odpovídajícími netransformovanými rostlinami.
- 5 Pomalejší růst některých okrasných rostlin produkujících trehalózu a malé morfologické změny pozorované alespoň u primárních transformantů, nejsou vždy nevýhodou: pomalejší růst a nový vzhled někdy představují atraktivní charakteristiky, zejména v případě okrasných rostlin používaných v místnostech.
- 10 V ještě dalším aspektu vynálezu je gen pro Tre6Psyntázu vhodně zřizován s rostlinným promotorem (např. LTI78 nebo RAB18), který je aktivován specifickou událostí nebo souborem podmínek (např. chladno nebo sucho), takže lze spustit akumulaci komerčně extrahovatelných množství trehalózy ve zralé rostlině krátce před sklizní, a tím se vyhnout jakýmkoli negativním vlivům trehalózy na časný vývoj některých rostlin.
- 15 Podle výše uvedeného zveřejnění jsou transgenní rostliny podle tohoto vynálezu jednoděložné rostliny, jako například kukuřice, oves, proso, pšenice, rýže, ječmen, čirok, laskavec, cibule, chřest nebo cukrová třtina, nebo dvojděložné rostliny, například vojtěška, sója, petúnie, bavlna, cukrová řepa, slunečnice, mrkev, celer, zelí, okurka, paprika, rajče, brambor, čočka, len,
- 20 brokolice, tabák, fazole, locika, řepka, květák, špenát, růžičková kapusta, artyčok, hrách, okra, dýně (*Cucurbita*), kapusta kadeřavá, *Brassica oleracea*, čajovník nebo kávovník.
- Je ukázáno, že kvasinkový gen TPS1 a jeho produkt jsou kompatibilní s biochemickým uspořádáním tabáku: gen byl exprimován s vysokou účinností a subjednotka o molekulové hmotnosti 56 kDa vyvolala syntézu trehalózy. Avšak v oboru je známo, že rostlinné geny někdy mají nižší poměry A+T než například mikrobiální geny, a že hladinu exprese heterologních genů v rostlinách lze zvýšit změnou použití kodonu, zejména blízko startu kódující sekvence, na hodnotu nalézanou v rostlinách (Perlak *et al.* (1991) 88, 3324–3328). Domníváme se, že tyto a podobné modifikace genů jsou výhodné v tomto vynálezu.
- 25 30 Je rovněž dobře známo, že se v genech vyskytují přirozené mutace. Tyto a arteficiální změny v DNA sekvenci někdy mění aminokyselinové sekvence kódovaných polypeptidů. Označení TPS1 (nebo TPS2 nebo TSL1), tak jak je použito zde, zahrnuje všechny DNA sekvence homologní s TPS1 (nebo TPS2 nebo TSL1), které kódují polypeptidy s požadovanými funkčními nebo strukturálními vlastnostmi subjednotky kvasinkové trehalózasyntázy, mající molekulovou hmotnost 56 kDa (nebo 102 kDa nebo 123 kDa). Podobně označení „geny pro Tre6Psyntázu (nebo Tre6Pázu) nebo regulační polypeptidy“ zahrnuje nejen takové geny, které lze snadno izolovat z přírodních organismů (např. použitím nukleotidových práb vytvořených ze známých sekvencí TPS1 nebo TPS2 nebo TSL1), ale rovněž přírodní a umělé varianty, které kódují
- 35 40 polypeptidy s požadovanými funkčními a strukturálními vlastnostmi polypeptidů kódovaných původně izolovanými geny.

Příklady provedení vynálezu

45

Obecný materiál a metody

Materiál. Byly použity rostliny *Nicotiana tabacum* cv. SR1 a *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. ekotyp C-24.

50

- Kvasinkové geny TPS1 (dříve nazývané TSS1) kódující Tre6Psyntázovou subjednotku trehalózasyntázy, mající molekulovou hmotnost 56 kDa, a TSL1 kódující regulační subjednotku trehalózasyntázy o molekulové hmotnosti 123 kDa byly získány z plazmidů pALK752 a pALK754 popsanych Vuorim *et al.* (1993) Eur. J. Biochem. 216, 849–861. Kvasinkový gen TPS2 byl
- 55 získán z plazmidu poskytnutého Dr. Claudio De Virgiliem a Dr. Andresem Wiemkenem

z Botanisches Institut der Universitat Basel ve Švýcarsku a klonován do místa SacI plazmidu YCplac111. Tento gen (popsaný v práci De Virgillia *et al.* (1993) Eur. J. Biochem. 212, 315–323) kóduje aminokyselinové sekvence odvozené ze subjednotky o molekulové hmotnosti 102 kDa, tak jak je ukázáno v tabulce 1 v práci Vuorio *et al.* (1993, *loc. cit.*). Antiséra připravená
 5 proti kvasinkové trehalózasyntáze (anti-TPS/P) a 56 kilodaltonové subjednotce (anti-57K) i obecně používané chemikálie byly získány ze zdrojů uvedených v práci Vuorio *et al.* (1993, *loc. cit.*). Vakuolární trehalóza byla částečně purifikována tak, jak je popsáno Londesboroughem a Varimem ((1984) Biochem. J. 219, 511–518) ze suc⁻ gal⁻ mel⁻ mal⁻ kvasinkového kmene (ALKO2967) a nehydrolyzovala sacharózu, maltózu ani melibiózu.

10 DNA manipulace. Všechny manipulace s DNA byly prováděny za použití zavedených laboratorních technik (Sambrook *et al.* (1989) v Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York). Kmeny *E. coli* DH5 a MC1061 byly použity pro plazmidové preparáty. Promotor použitý k regulaci exprese TPS1 pocházel z genu *ats1A* *A. thaliana*, který kóduje
 15 malou subjednotku Rubisco (Krebbers *et al.* (1988) *loc. cit.*).

Pro konstrukci chimérického genu *ats1A-TPS1* promotorový fragment *ats1A*, kterému chyběla sekvence pro tranzitní peptid, byl amplifikován pomocí PCR z plazmidu pGSFR401. Syntetické oligonukleotidové primery byly použity k vytvoření místa pro EcoRI na 5'konci a místa XbaI na
 20 3'konci amplifikovaného fragmentu. Amplifikovaný produkt získaný pomocí PCR byl štěpen příslušnými restriktčními enzymy a po purifikaci na agarózovém gelu byl vložen do plazmidů pUC19, rozštěpeného pomocí enzymů EcoRI a MluI. Kvasinkový gen TPS1 byl amplifikován z plazmidu pALK752 popsaného výše. Výsledný fragment obsahoval 5' MluI a 3'XbaI místa. Po digesci a purifikaci byl fragment ligován za *pats1A* v pUC19. Fragment obsahující konstrukt
 25 promotor-TPS1 byl připraven pomocí restriktáz EcoRI a XbaI a potom vložen do pBluescriptII SK⁺ (Stratagene)-odvozeného plazmidu nesoucího 3'konec T-DNA genu G7 zahrnujícího jeho polyadenylační signál a pravou hraniční sekvenci T-DNA. Nakonec byla celá genová chiméra vložena jako EcoRI-SacI fragment do rostlinného transformačního vektoru pDE1001 (Denecke
 30 *et al.* (1992) EMBO J. 11, 2345–2355), obsahujícího chimérický gen pro rezistenci ke kanamycinu pNOS-NEO-3'OCS jako selektivní marker. Výsledkem byl plazmid pKOH51, nesoucí genovou chiméru *pats1A-TPS1-3'G7*. Konstrukty byly klonovány v kmeni *E. coli* DH5 pomocí transformace a poté převedeny pomocí elektroporace (Dower, Miller a Ragsdale (1988) Nucl. Acids. Res. 16, 6127–6145) do *Agrobacterium tumefaciens* (C58C1 rif^R), obsahujícího neokogenní Ti
 35 plazmid pGV2260 (Deblare *et al.* (1995) Nucl. Acids. Res. 13, 2777–2788).

Ostatní konstrukty byly připraveny obdobným způsobem.

Růst rostlinného materiálu. Pro zajištění růstu ve sterilních podmínkách byly sterilizované explantáty *Nicotiana tabacum* (SR1) umístěny do skleněných nádob, obsahujících pevné
 40 MS médium (Murashige a Skoog (1962) Physiol. Plant. 15, 473–497), do něhož byla přidána sacharóza v koncentraci 2 hmotn. % (MS-2). Tyto nádoby byly potom umístěny do kultivační komory, kde bylo možno kontrolovat podmínky růstu, kde rostliny rostly při 22 °C s fotoperiodou 16 hodin. Explantáty byly pravidelně převáděny do nových nádob, obsahujících MS-2 médium, aby byl zajištěn kontinuální růst za sterilních podmínek. Skleníkové rostliny rostly
 45 v půdě v květináčích a byly denně zalévány. Transformované rostliny *A. thaliana* byly nejprve kultivovány za sterilních podmínek v dětských lahvích v kontrolovaném prostředí tak, jak je popsáno výše pro tabák, a později byly převedeny do půdy v květináčích umístěných ve skleníku, aby bylo dosaženo produkce semen. Semena z primárních transformantů byla buď přímo vsazena do půdy, aby bylo dosaženo nového cyklu produkce semen, nebo byl jejich povrch sterilizován
 50 a semena byla kultivována ve sterilních podmínkách na kultivačních destičkách o 24 jamkách pro budoucí molekulární analýzu.

Transformace rostlin. Tabák a *A. thaliana* byly transformovány následujícím způsobem. Počátečním materiálem byly vyříznuté listy tabáku a kořeny *A. thaliana*. Transformace a tkáňové kultury

- byly prováděny tak, jak popsal Valvekens *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 5536–5540), s následujícími modifikacemi. Izolované kořeny nebo listy byly preinkubovány na pevném, kalusy-indukujícím médiu (CIM) po dobu 4 dnů, kořeny byly nařezány na malé segmenty (1–2 mm) a listy byly nařezány na větší kousky (10–20 mm) a přeneseny do 20 ml tekutého CIM.
- 5 3',5'-Dimethoxy-4'-hydroxyacetofenon byl přidán (0,2 mg/l) před infekcí *Agrobacteriem* (C58Cl rif^R). Bakterie použité pro infekci byly kultivovány přes noc v YEB médiu (Vervliet *et al.* (1975) J. Gen. Virol. 26, 33–48), které obsahovalo vhodná antibiotika, při 28 °C, a byly odděleny centrifugací. Bakteriální peleta byla pak resuspendována v 10 mM MgSO₄, bakterie byly přidány k rostlinné tkáni a systém byl jemně míchán po dobu 15 minut. Nadbytečná tekutina byla slita
- 10 a kořeny přeneseny na sterilní filtrační papír. Po dvoudenní kokultivaci na pevném CIM byla rostlinná tkáň opláchnuta 3 až 4krát tekutým CIM, aby se tkáň zbavila bakterií, a přenesena na selektivním indukčním médiu (SIM). Po 7 dnech růstu byly explantáty s diferenciovanými morfofenetickými sektory přeneseny na čerstvé SIM.
- 15 Extrakce proteinů pro Western analýzu. Rostlinné vzorky o hmotnosti 100 až 200 mg čerstvé váhy byly homogenizovány skleněnou tyčinkou v 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavkách se 100 ml pufru na extrakci proteinů (50 mM Tris/HCl pH 7,2, 250 mM sacharóza, 5 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 mM β-merkapt ethanol, 1 mM fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 30 M pepstatin, 50 M leupeptin a 15 M aprotinin). Nerozpustný materiál byl odstraněn
- 20 dvěma centrifugacemi (13 000 g, 10 minut). Koncentrace proteinů v supernatantech byla měřena podle Bradfordové (1976) Anal. Biochem. 72, 248–254) s použitím hovězího albuminu jako standardu. Stejná množství rozpustných proteinů byla nanášena na SDS–PAGE pro imunologické studie.
- 25 SDS–PAGE a imunologické techniky. Proteiny byly odděleny pomocí SDS–PAGE elektroforézy (Laemmli (1970) Nature 227, 680–685). Proteiny byly detekovány technikou imunoblottingu s antisérem anti-57 (ředění 1/1000) a králíčí protilátkou proti antiséru 57, na níž byla navázána alkalická fosfatáza jako marker. Pro Western blotovací techniku byly bílkoviny elektroforeticky přeneseny na nitrocelulózoové filtry a obarveny pomocí 0,5 % Ponceau Red v 5% kyselině octové,
- 30 aby byla potvrzena rovnoměrnost nanášení a úspěšnost přenosu. Filtry byly potom blokovány přes noc 5% suchým mlékem v prášku, které neobsahovalo tuk, a detekce a barvení byly provedeny standardním způsobem.
- 35 Stanovení Tre6Psyntázy. Přibližně 500 mg zmrazeného rostlinného materiálu bylo zváženo a rozetřeno na jemný prášek v třecí misce s pevným CO₂. Prášek byl převeden do 0,7 ml 50 mM roztoku HEPES/KOH pH 7,0, obsahujícího 1 mM benzamidin, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA a 1 mM dithiotreitol (HBMED), dále obsahujícího 1 mM PMSF a 10 M koncentrace pepstatinu A a leupeptinu, a směs byla ponechána aby roztála. Výsledný homogenát byl zcentrifugován 10 minut při 17 000 g a v supernatantu byla stanovena aktivita Tre6Psyntázy způsobem podle
- 40 Lappa *et al.* (1971) J. Biol. Chem. 246, 4567–4579). Vzorek (10 ml) byl přidán k 90 ml reakční směsi obsahující 40 mM HEPES/KOH pH 7,0, 10 mM MgCl₂, 10 mM glukózu 6-fosfát, 5 mM fruktóza 6-fosfát, 5 mM uridindifosfoglukózu (UDPG) a 1 mg/ml hovězího albuminu, a směs byla inkubována při 30 °C po požadovanou dobu. Reakce byla zastavena zahříváním na 100 °C po dobu 2 minut. Deriváty cukrů (včetně veškeré vytvořené sacharózy) kromě trehalózy
- 45 a trehalóza 6-fosfátu byly hydrolyzovány přidáním 50 ml 0,6 M HCl a zahříváním při 100 °C po dobu 5 minut a potom bylo přidáno 50 ml 8% NaOH a směs byla opět zahřívána 15 minut při 100 °C. Zbývající cukry (tj. trehalóza a trehalóza 6-fosfát) byly stanoveny pomocí anthronového stanovení (Trevelyan a Harrison (1956) Biochem. J. 63, 23–33).
- 50 Stanovení trehalózy. Přibližně 500 mg zmrazeného rostlinného materiálu bylo rychle odváženo do skleněné zkumavky. Byla přidána horká destilovaná voda (1 ml) a směs byla povařena po dobu 20 minut a listová hmota byl občas rozrušována tupou skleněnou tyčinkou. Kapalná fáze byla odebrána Pasteurovou pipetou a pevná fáze znovu extrahována 0,5 ml vody. Spojené kapalně fáze byly přečištěny centrifugací. Spojené pevné zbytky byly vysušeny do konstantní
- 55 váhy při 107 °C (suché hmotnosti listů v průměru činily 5,1 % čerstvých hmotností). Supernatant

byl analyzován s použitím kapalinového chromatografu s Dionexem DX-300, který byl vybaven Dionexovým pulzním elektrochemickým detektorem (PED-2). Vzorke (20 μ l; ve třech paralelách) byly injikovány pomocí předkolony Carbpac PA-1 (4 x 50 mm) na kolonu Carbpac PA-1 (4 x 250 mm) a eluovány vodou rychlostí 1 ml/min. Elutát byl smísen s reagens (0,6 ml/min 0,3 M NaOH). Trehalóza se objevila ve 3. minutě, daleko před glukózou a sacharózou, jejichž maxima se objevovala až okolo 20. minuty.

Příklad 1

Produkce trehalózy tabákovými rostlinami transformovanými kvasinkovým TPS1 genem regulovaným *ats1A* promotorem.

Transformované a kontrolní rostliny tabáku byly kultivovány jak ve sterilních podmínkách *in vitro*, tak i ve skleníku. Zralí transformanti neměli odlišný fenotyp od netransformovaných kontrol nebo od kontrol transformovaných vektorem pDE1001 (který neobsahoval TPS1). Listy byly sklizeny v 09,00 hodin, zmrazeny a uskladněny při teplotě -70°C nebo nižší, dokud nebyly analyzovány.

Z 26 testovaných transformantů rezistentních k účinku kanamycinu jich 20 produkovalo detekovatelná množství imunoreaktivních polypeptidů o očekávané velikosti, jestliže byly testovány s antisérem, připraveným proti purifikované subjednotce Tre6Psyntázy kvasinkové trehalózasyntázy, která má molekulovou hmotnost 56 kDa. Příklady jsou uvedeny na obr. 2. Tabulka 1 shrnuje obsah trehalózy v listech.

Výsledky ukazují, že kvasinkový gen TPS1 je v tabáku účinně exprimován, jestliže je jeho promotor nahrazen promotorem *ats1A*. Specifický signál pozorovaný na Western blot stanovených má správnou molekulovou hmotnost. Nejsilnější signály (např. signál z transformantu 4 kultivovaného *in vitro*) byly jen o málo slabší v přepočtu na jednotku vneseného proteinu než signály získané z kvasinkového materiálu, sklizeného ve stacionární fázi růstu. Expres TPS1 byla doprovázena objevením se trehalózy v tkáni listů, což bylo identifikováno jak chováním na HPLC, tak i skutečností, že cukr byl degradován vysoce specifickou trehalózou (viz rovněž obr. 3). Různí transformanti exprimovali produkt TPS1 v různých

Tabulka 1. Obsah trehalózy v TPS1 transformantech tabáku.

Tabáková rostlina	Zvláštní působení	Trehalóza (mg/g čerstvých listů)
<i>Rostliny in vitro</i>		
Netransformovaná SR1	–	0,002
pDE1001 kontrola	–	0,002
Transformant 1	–	0,02
Transformant 3	–	0,009
Transformant 4	–	0,067
Transformant 8	–	0,075
Transformant 8	extrakce ethanolem místo vody	0,055
<i>Skleníkové rostliny</i>		
pDE1001 kontrola	–	0,002
Transformant 1	–	0,16
Transformant 4	–	0,16
Transformant 4	alkalická fosfatáza ^a	0,13
Transformant 5	–	0,052
Transformant 6	–	0,044
Transformant 8	–	0,039
Transformant 8	specifická trehalóza	0,021
Transformant 19	–	0,053
Transformant 19	alkalická fosfatáza ^a	0,060
Transformant 19	specifická trehalóza	0,016
Transformant 25	–	0,036
Transformant 26	–	0,11

^aExtrakt byl podroben působení alkalické fosfatázy za podmínek, kdy nosič [¹⁴C]trehalóza 6-fosfát byl defosforylován.

hladinách z důvodů, které dosud nejsou známy. Se zjevnou výjimkou, kterou byl Transformant 8, množství trehalózy nalezené v listech zhruba korelovalo se silou signálu 56 kDa ve Western blot stanoveních (srovnej obr. 2 a tabulku 1). Ačkoliv tyto transformanti nanesou gen kódující rekombinantní Tre6Pázu, nebyl podán důkaz, že rostliny akumulovaly více Tre6P než trehalózy. Zřejmě tabák má fosfatázy, které jsou schopny přeměnit Tre6P na trehalózu což ukazuje, že alespoň v případě této rostliny je klíčovým enzymem nutným k vnesení trehalózové syntetické dráhy Tre6P syntáza, a že vnesení tohoto samotného enzymu je vhodné, i když ne nutně optimální.

Určení distribuce v tkáních subjednotky Tre6P syntázy mající molekulovou hmotnost 56 kDa v transgenní linii 4 ukázalo, že značná množství tohoto polypeptidu lze nalézt ve všech zelených částech rostliny vyjma nižšího stonku, ale nikoli v kořenech (obr. 4). Distribuce je ve shodě s tkáňovou specifičností exprese *ats1A* genu (De Almeida *et al.* (1989) Mol. Gen. Genet. 218, 78). Obr. 4 rovněž ukazuje, že tkáně v nichž byla Tre6P syntáza exprimována, rovněž obsahovaly trehalózu. Navíc byla malá množství trehalózy nalezena v kořenech, což ukazuje, že transgenní tabák transportuje trehalózu z místa syntézy do jiných tkání.

Výsledky rovněž ukázaly, že tabákové rostliny exprimující TPS1 regulovaný promotorem *ats1A* a akumulující trehalózu v zelených tkáních během osvětlení denním světlem jsou zdravé a mají normální vzhled. Ačkoliv primární transformanti, obsahující genovou chiméru TPS1 měli některé malé morfologické alterace, jako například listy ve tvaru skalpelu, sníženou apikální dominanci a nižší výšku (viz obr. 5 a 6), většina změn se neprojevila v samosprašném, TPS pozitivním potomstvu, které stále produkovalo trehalózu (viz obr. 6). Proto se zdají být morfologické změny v primárních transformantech artefakty tkáňové kultury, spíše než výsledky produkce trehalózy.

Vysoká hladina produkce Tre6Psyntázové subjednotky a přítomnost trehalózy však vedly k 20 až 50% snížení růstové rychlosti u transgenních rostlin za normálních podmínek ve srovnání s netransformovanými kontrolami. Zjevně normální fenotyp těchto transgenních rostlin je v kontrastu k publikované toxicitě exogenně přidané trehalózy k některým rostlinám (Veluthambi *et al.* (1981) *loc. cit.*). Tyto výsledky ukazují, že produkce *in planta* pod kontrolou promotoru *ats1A* není pro tabák toxická, ačkoli může přispívat k určitému snížení růstové rychlosti. Indukovatelné promotory spouštěné specifickými událostmi, jako je sucho a zima, lze použít k minimalizaci efektu na snížení růstové rychlosti tím, že tyto promotory vyvolávají produkci trehalózy pouze když je tato zapotřebí.

Na základě proteinové analýzy představují obsahy trehalózy v nejlepších transformantech uvedené v tabulce 1 (např. 16 mg/g proteinu u transformanta 4) již alespoň 20 % hladiny, při níž nastává jasné zlepšení termotolerance u kvasinek (De Virgilio *et al.* (1990) FEBS Letters 273, 107–110).

Někteří TPS1 transformanti a kontroly byly analyzovány z hlediska přítomné Tre6Psyntázové aktivity. Výsledky ukázané v tabulce 2 jsou průměry jejich limity ze stanovení v čase 0,15 a 30 minut, provedeném ve dvou paralelních vzorcích. U kontrol byla Tre6Psyntázová aktivita nulová. U transformanta 4 se cukr, stabilní v kyselém i alkalickém prostředí, akumuloval v přítomnosti UDPG a Glc6P. Tato akumulace vyžadovala GlcP, ale nikoli fruktóza 6-fosfát (Fru6P; tento hexosafosfát aktivuje nativní trehalózasyntázový komplex kvasinek) a neprobíhala, jestliže byl UPDG nahrazen ADPG (enzym purifikovaný z kvasinky rovněž nepoužívá ADPG). Akumulovaný cukr je pravděpodobně trehalóza nebo Tre6P, protože jiné produkty jsou zničeny hydrolýzou. Analýza HPLC ukázala, že nešlo o trehalózu. Tedy za podmínek *in vitro* stanovení je Tre6P syntetizován extrakty transformanta 4 rychleji než je konvertován na trehalózu. To ukazuje, že celkovou rychlost syntézy trehalózy v listech lze zvýšit kotransformací s TPS2, který kóduje subjednotku Tre6Pázy.

Tre6Psyntázová aktivita kvasinkových extraktů, zjištěná způsobem použitým v tabulce 2, souhlasila s aktivitou zjištěnou měřením objevujícího se UDP tak, jak popsali Londesborough a Vuorio ((1991) J. Gen. Microbiol. 137, 323–330). Dále, kvasinkové extrakty měřené v přítomnosti extraktů tabákových rostlin nebyly inhibovány. Tedy nepřítomnost aktivity v kontrolních rostlinách v tabulce 2 není dána interferencí s některým faktorem přítomným v tabákových extraktech.

Tabulka 2. Tre6Psyntázová aktivita TPS1 transformovaných a kontrolních tabákových listů (všechny výsledky byly získány s rostlinami za sterilních podmínek *in vitro*).

Transformant	Směs stanovení	Aktivita Tre6Psyntázy (mU/g čerstvých listů)			
		15 min		30 min	
Netransformovaná kontrola	úplná	3	47	3	21
PDE1001 kontrola	úplná	22	35	7	8
Transformant 4 pokus 1	úplná	259	147	60	6
Transformant 4 pokus 2	úplná	128	39	155	22
	bez GlcP	12	19	–1	12
	bez Fru6P	153	10	144	3
	ADPG místo UDPG	0	52	4	21

Tre6Psyntázová aktivita zjištěná u transformanta 4 byla nestabilní. U některých extraktů aktivita zmizela během několika hodin, kdy byly skladovány na ledu. Avšak specifický pás pozorovaný u analýz typu Western byl stále přítomen prakticky v nezměněné intenzitě v extraktech, které

byly uskladněny 24 hodin při teplotě místnosti. Je tedy pravděpodobné, že konformace Tre6Psyntázové subjednotky se mění v průběhu skladování tabákových extraktů. Tyto výsledky ukazují, že zvýšená aktivita Tre6Psyntázy bude dosažena transformací tabáku současně TPS1 a jednou nebo několika jinými subjednotkami kvasinkové trehalózasyntázy, čímž se zvýší konformační stabilita subjednotky Tre6Psyntázy.

Příklad 2

Transgenní *Arabidopsis thaliana*.

Rostliny *A. thaliana* obsahující TPS1 regulovaný promotorem *ats1A* byly konstruovány stejným způsobem, jaký je popsán výše pro tabákové transformanty. Vzhled těchto transformovaných rostlin *Arabidopsis* je rovněž normální a rostliny jsou zdravé a produkují fertilní semena. Analýza Western typu rostlin kultivovaných ze semen primárních transformantů ukázala, že rostliny obsahovaly subjednotku kvasinkové trehalózasyntázy, mající molekulovou hmotnost 56 kDa (obr. 10). Je zřejmé očekávat, že tyto rostliny akumulují trehalózu v zelených tkáních.

Příklad 3

Odolnost trehalózu produkujících rostlin tabáku k sušení.

Aby bylo možné stanovit, zda množství trehalózy produkovaná transgenním tabákem jsou dostatečná, aby zvýšila odolnost k sušení, byly oddělené listy z kontrol a transgeních linií pěstovaných *in vitro* sušeny vzduchem (25% relativní vlhkost, RH) (obr. 5). Zatímco oddělené listy kontrolních rostlin rychle ztrácely vodu a ukazovaly známky hnědnutí po 3 hodinách stresu, listy trehalózu produkujících rostlin zůstaly zelené až do 24 hodin při jasně snížené ztrátě vody. Protektivní účinek trehalózy je tedy dvojitý: za prvé, oddělené listy transgenních rostlin syntetizujících trehalózu nejprve projevily lepší retenci vody. Teprve po dlouhém sušení tento rozdíl mezi trehalózu produkujícími a kontrolními rostlinami zmizel. Za druhé, kontrolní listy vykazovaly jasné známky stárnutí a hnědnutí. Naopak listy z trehalózu produkujících rostlin zůstaly zelené alespoň 24 hodin a teprve prodloužené sušení (několik dní) vyvolalo určité zhnědnutí. Existoval jasný rozdíl mezi trehalózu produkujícími a kontrolními rostlinami i při stejném obsahu vody. Trehalóza tedy chrání rostlinnou tkáň před účinky dehydratace a snižuje rychlost jakou se voda ztrácí. Hnědnutí by alespoň částečně mohlo být způsobeno Maillardovou reakcí, kdy redukující cukry reagují s volnými aminoskupinami polypeptidů a aminokyselin, a vzniká hnědá barva. Jako neredukující cukr se trehalóza neúčastní této reakce, a dokonce inhibuje reakci mezi jinými cukry a proteiny (Roser a Colaco (1993) New Scientist 1873, 24).

Ochrana oddělených listů trehalózou před poškozením účinkem sušení ukázala, že trehalóza by měla mít podobný účinek i na úrovni celých rostlin. Abychom prokázali, že trehalóza zvyšuje toleranci intaktních rostlin k vysychání, byly rostliny kultivované *in vitro* vystaveny sušení vzduchem (30% RH, obr. 6A). Kontrolní rostliny ztratily turgor a zvadly během 3 až 4 hodin. Naopak trehalózu produkující transgenní rostliny naznačovaly ztrátu turgoru po prodlouženém sušení. Po 17 hodinách sušení byly rostliny rehydratovány a zkoumáno přežívání rostlin (obr. 6A). Netransformované kontrolní rostliny tento pokus nepřežily a ani po prodloužené rehydrataci nedošlo k jejich zotavení. Naopak, trehalózu produkující transgenní linie, ačkoli byly zřetelně zvadlé a ztratily většinu jejich tkáňové vody (pokles až na hodnotu 30 % reziduální čerstvé hmotnosti), přežily 17 hodin sušení.

Zvýšené přežívání podmínek sucha se ukázalo i u mladých rostlinek (obr. 6B). Když byly 3 týdny staré rostlinky transgenní linie 8 spolu s netransformovanými a vektorem transformovanými kontrolními rostlinkami vystaveny sušení vzduchem (50% RH), byl zjištěn jasný rozdíl v toleranci k suchu mezi trehalózu produkujícími a kontrolními rostlinami. Transgenní trehalóza

pozitivní linie 8 vykazovala jak zpomalenou ztrátu turgoru, tak zvýšené přežívání dehydratujícího stresu ve srovnání s kontrolními rostlinami (obr. 6B).

5 Příklad 4

Produkce trehalózy rostlinami kotransformovanými genem kódujícím Tre6Psyntázu a jedním nebo několika geny kódujícími Tre6Pázu nebo regulační polypeptid.

- 10 Odborník dokáže připravit vektory, obsahující kódující sekvence kvasinkových genů TPS2 a TLS1 pod kontrolou *ats1A* promotoru a použít je k transformaci tabáku, *Arabidopsis*, a jiných rostlin způsoby, které jsou popsány v Obecném materiálu a metodách a v příkladu 1. Rostliny najednou transformované pomocí TPS1 a jedním nebo oběma dalšími geny TPS2 a TLS1 lze získat křížením jednotlivých transformantů, další transformaci již transformované rostliny
- 15 druhým genem nebo transformací vektory, obsahujícími dva nebo tři geny vázané s vhodnými promotory: například TPS1 vázaný s nekonstitutivním promotorem *ats1A*, aby syntéza trehalózy a případně jiný gen nebo geny regulované konstitutivními promotory byly pod jeho kontrolou.

- Předpokládá se, že řízená exprese genů pro dvě nebo více subjednotek kvasinkového trehalóza-syntázového komplexu, z nichž alespoň jedna má molekulovou hmotnost 56 kDa, vyústí ve zvýšenou akumulaci trehalózy v zelených tkáních rostliny, protože 56 kilodaltonová subjednotka bude stabilizována přítomností druhé subjednotky nebo subjednotek. Rovněž zavedení Tre6Pázové subjednotky o molekulové hmotnosti 102 kDa bude výhodné, neboť tím bude snížen očekávaný potenciál akumulace Tre6P, jestliže bude stabilita Tre6Psyntázové jednotky zvýšena.
- 25 Je zřejmé, že pro tento typ konstrukce TPS1 kódující sekvenci lze nahradit kódující sekvencí nějakého dalšího strukturálního genu pro Tre6Psyntázu, TPS2 sekvencí sekvencí některého jiného Tre6Pázového genu a TLS1 sekvencí sekvencí některého jiného genu kódujícího polypeptid, který udílí regulační vlastnosti nebo stabilitu Tre6Psyntáze a Tre6Páze stejným způsobem, jako TLS1 produkt udílí takové vlastnosti jiným subjednotkám přirozené kvasinkové trehalózasyntázy.
- 30

Příklad 5

- 35 Transformace rostlin geny pro Tre6Psyntázu pod kontrolou stresem indukovaných promotorů.

- Rostlinné promotory jako jsou LTI78 (Nordin *et al.* (1993) Plant Mol. Biol. 21, 641–653) a RAB18 (Lang a Palva (1992) Plant Mol. Biol. 20, 951–962) jsou známy tím, že jsou indukovány suchem a chladovým stresem. Transformací tabáku, *Arabidopsis* a jiných rostlin kódující sekvencí genu pro Tre6Psyntázu, jako je TPS1 pod kontrolou takového stresem indukovaného promotoru, samotného nebo dohromady s kódujícími sekvencemi genů pro Tre6Pázu nebo regulační polypeptid nebo obou, jako jsou TPS2 a TLS1 pod kontrolou jakéhokoli vhodného rostlinného promotoru, lze vyvolat akumulaci trehalózy v rostlinných tkáních pouze v odpovědi na tyto typy stresu. Výhodou je, že hladiny trehalózy, které mají negativní účinek na některé tkáně určitých rostlin, a které rovněž představují odchylku fotosyntetické funkce, která snižuje její výtěžek a někdy zpožďuje růst rostliny, se akumulují pouze (1) jestliže je rostlina náhodně vystavena stresu (výhody ochrany poskytované trehalózou převáží jakékoli negativní účinky) nebo (2) jestliže je rostlina záměrně vystavena stresu aby došlo k akumulaci trehalózy, která pak bude extrahována ze sklizené rostliny.
- 45

50

Příklad 6

Purifikace, analýza a klonování jiných Tre6Psyntáz.

5 Ačkoli existují i jiné metabolické dráhy syntázy trehalózy, je zřejmé, že hlavní syntetická dráha jde přes Tre6P, jak to popsali Cabib a Leloir (1958, *loc. cit.*). Klíčový enzym v této dráze je Tre6Psyntáza, jelikož, jak je ukázáno výše, jestliže je Tre6P vytvořen, mnoho buněk bude schopno tuto látku defosforylovat za vzniku volné trehalózy. Tedy hlavní myšlenkou tohoto vynálezu je vnést Tre6Psyntázovou aktivitu do cílové rostliny. Není primárně důležité, odkud
10 tato aktivita pochází. Používáme kvasinkový enzym, který náhodou je subjednotkou kvasinkového komplexu trehalózasyntázy, který obsahuje ještě nejméně dvě další subjednotky. V obdobných případech je možné, že optimální aktivita Tre6Psyntázové subjednotky bude vyžadovat přítomnost jedné nebo několika ostatních subjednotek, ačkoli zjevně subjednotka kvasinkové Tre6Psyntázy o molekulové hmotnosti 56 kDa účinně funguje v tabáku bez subjednotek o 102 a
15 123 kDa.

Je dobře známo, že enzymy katalyzující stejnou reakci v odlišných organizmech jsou často homologní, takže jestliže byl jednou člen této skupiny klonován, úkol klonovat ostatní členy této skupiny je snadnější. Jelikož kvasinková Tre6Psyntáza byla klonována (Londesborough a Vuorio
20 (1992) USPA 07/836021), je jasné, že existuje skupina homologních proteinů, včetně Tre6Psyntázy z *E. coli* a proteinu z *Methanobacterium thermoautotrophicum* (McDougall *et al.*, (1993) FEMS Microbiology Letters 107, 25–30). Rozhodli jsme se otestovat, zda jiné organizmy rovněž obsahují homologní Tre6Psyntázy.

25 *Mycobacterium smegmatis* obsahuje heparinem aktivovanou Tre6Psyntázu, která byla částečně purifikována a studována Elbeinovou skupinou (Liu *et al.*, (1969) J. Biol. Chem. 244, 3728–3791; Lapp *et al.*, (1971) J. Biol. Chem. 246, 4567–4579; Elbein a Mitchell (1975) Arch. Biochem. Biophys. 168, 369–377; Pan *et al.* (1978) Arch. Biochem. Biophys. 186, 392–400). Enzym purifikovaný těmito pracovníky měl specifickou aktivitu 0,8 U/mg proteinu při 37 °C s GlcP a UDPG jako substráty (enzym je schopen používat řadu nukleosid–difosfoglukózových
30 derivátů) v přítomnosti optimální koncentrace heparinu. Preparát obsahoval dva polypeptidy s molekulovými hmotnostmi, stanovenými pomocí SDS–PAGE, 45 a 90 kDa. My jsme modifikovali jejich purifikační postup tím, že jsme do něj zahrnuli inhibitory proteáz a jiná agens chránící proteiny v použitých pufrech a přidali konečný chromatografický krok v přítomnosti
35 neiontového detergentu Tritonu X–100. Náš konečný postup byl následující:

1) Buňky *M. smegmatis* (28 g čerstvé hmotnosti rostoucí 3 dny v Luriově médiu a skladované v zmrazeném stavu) byly rozmrazeny ve 40 ml 50 mM HEPES/KOH pH 7,5 obsahujícího 1 mM benzamidin, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM dithiotreitol, 1 mM fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) a 10 g pepstatinu A/ml a potom rozbity ve French pressu. Homogenát byl centrifugován
40 20 minut při 28 000 g. (NH₄)₂SO₄ (30 g na 100 ml) byl přidán k supernatantu. Vysrážený protein byl shromážděn, rozpuštěn v 20 mM HEPES/KOH pH 7,5 obsahujícím 0,1 mM EDTA a 0,2 mM dithiotreitol (HED pufr), dále obsahujícím 1 mM PMSF a 10 g pepstatinu A/ml, a dialyzován přes noc proti HED pufru.

45 2) Dialyzovaný roztok byl nanesen na sloupec DEAE celulózy o rozměrech 3,4 x 25 cm a enzym byl eluován při průtoku 20 ml/hodinu lineárním gradientem maximálně obsahujícím 0,9 M NaCl v 1,2 l HED pufru. Maxima enzymových frakcí (při 0,2 M NaCl) byla spojena (33 ml) a upravena na konečnou koncentraci 0,5 mM PMSF a 5 g pepstatinu A/ml. Protein byl
50 vysrážen přidáním 9,9 g (NH₄)₂SO₄ a rozpuštěn v 50 mM Tris/HCl pH 7,5 obsahujícím 50 mM NaCl, 0,1 mM EDTA a 0,2 mM dithiotreitol (TNED pufr).

3) Rozpuštěné proteiny (3,7 ml) byly chromatografovány na koloně Sephadexu G100 (2,8 x 34 cm), která byla ekvilibrována TNED pufrém při průtoku 36 ml/hodinu. Enzymové
55 frakce v maximech byly ihned nanesený na sloupec Heparin Separózy (1,5 x 8,5 cm) v TNED

pufu. Sloupec byl vyvíjen gradientem maximálně obsahujícím 1,0 M NaCl v objemu 100 ml při rychlosti průtoku 5 ml/hodinu. Enzym byl eluován přibližně při koncentraci 0,5 M NaCl.

- 4) Vzorek eluátu z Heparin Separózy (frakce H37 v tabulce 3) byl převeden do TND/0,1 % (V/V) Triton X-100 v zařízení Amicon (membrána PM10) a potom nanesen na sloupec Heparin Separózy (0,7 x 8 cm) ekvilibrované TND obsahujícím 0,1 % (V/V) Triton X-100 a eluován gradientem maximálně obsahujícím 1,0 M NaCl v 50 ml stejného pufu.

- Ačkoli specifické aktivity po prvním kroku využívajícím Heparin Separózu byly mnohem větší než bylo oznámeno Panem *et al.* (1978), SDS-PAGE (obr. 7) ukázala, že tyto frakce nebyly čisté. Překvapivě bylo maximum při hodnotě 55 kDa jediným hlavním pásem (band), pro nějž intenzita dobře korelovala s enzymovou aktivitou. Band o hodnotě 55 kDa byl oddělen a rozpuštěn v gelu s trypsinem a tryptické peptidy byly odděleny pomocí HPLC a sekvenovány tak, jak je popsáno (Londesborough a Vuorio, 1993 *loc. cit.*). Sekvence jsou uvedeny v tabulce 4 a v Seznamu sekvencí. Pro peptidová maxima

Tabulka 3. Purifikace Tre6Psyntázy z *M. smegmatis*

- 20 Tre6Psyntáza byla stanovena jak popisují Londesborough a Vuorio (1993, *loc. cit.*), avšak při teplotě 35 °C a v přítomnosti 0,25 g heparinu/ml.

Frakce	Objem (ml)	Specifická aktivita (mU/mg)	Celková aktivita (U)
Supernatant (28 000 g)	154	9	25,0
Dialyzovaný precipitát vysrážený pomocí (NH ₄) ₂ SO ₄	52	21	35,2
DES2 eluát	33	139	23,4
G100 eluát	21	385	14,6
První eluát z Heparin Separózy			
frakce H33	2,7	1880	0,9
frakce H34	2,7	4380	2,1
frakce H35	2,7	6190	2,7
frakce H36	2,7	7890	2,8
frakce H37	2,7	6340	1,6
Druhý eluát z Heparin Separózy (naneseno pouze H37)			
frakce T21	1,4	ND	0,08
frakce T22	1,4	ND	0,14
frakce T23	1,4	ND	0,06

- 25 29 a 31, která poskytovala dvojité sekvence, byly aminokyseliny libovolně přiřazeny podle SEQ ID NOs 3 a 4 (z maxima 29) a SEQ ID NOs 6 a 7 (z maxima 31) stejným způsobem, jak je ukázáno v tabulce 4. Prvních 9 zbytků Peptidu 13 je z 89 % identických se zbytky 250–258 (VGAFPIGID; viz Vuorio *et al.* 1993 *loc. cit.*; EMBL katalog přírůstků č. X67499) kvasinkové Tre6Psyntázy o molekulové hmotnosti 56 kDa.

Tabulka 4. Aminokyselinové sekvence vnitřních tryptických peptidů získaných z Tre6Psyntázy purifikované z *M. smegmatis*.

Pík peptidu	Sekvence	Seznam sekvencí
13	VGAFPIDSAEL	SEQ ID NO:1
21	AT/GFLDALAATGETGDSGVT	SEQ ID NO:2
29 (dvojitý)	RVVVNNTSR	SEQ ID NO:3
	YLEGAR	SEQ ID NO:4
25	QVLAHDVDR	SEQ ID NO:5
31 (dvojitý)	IGGAQPAD	SEQ ID NO:6
	VGALQVLL	SEQ ID NO:7
43	GEVQVGFR	SEQ ID NO:8

- 5 Abychom potvrdili, že tento band o molekulové hmotnosti přibližně 56 kDa představuje Tre6Psyntázu, pokusili jsme se o další purifikaci. Enzym se vázal pevně k UDP-glukuronát agarózovému sloupci, ale nemohl být uvolněn zpět. Proto byla frakce H37 převedena do pufru, obsahujícího 0,1 % Triton X-100 (dvě třetiny aktivity byly během tohoto přenosu ztraceny) a znovu chromatografována na Heparin Separóze v přítomnosti Tritonu X-100. Obr. 8 ukazuje, že band mající molekulovou hmotnost přibližně 55 kDa byl jediný materiál reagující s Coomassie Blue, který byl přítomen v aktivních frakcích, kromě dvou slabých pásů menších než cytochrom c. Zřejmě polypeptid mající molekulovou hmotnost 90 kDa popsany Panem *et al.* (1978; *loc. cit.*) není podstatnou složkou této Tre6Psyntázy z *M. smegmatis* a velikost důležitého polypeptidu, přibližně 55 kDa, je znatelně větší než velikost malého polypeptidu (45 kDa), což je složka, o níž referují uvedení autoři. Obr. 9 ukazuje, že tento polypeptid je rozeznáván antisérem, které je vytvořeno proti subjednotce Tre6Psyntázy kvasinkové trehalózasyntázy, která má molekulovou hmotnost 56 kDa, ale nikoli preimunním sérem, což ukazuje, že Tre6P syntáza *M. smegmatis* sdílí antigenní determinanty s kvasinkovým enzymem. Povaha ostatních imuno-reaktivních pásů přítomných v relativně surových preparátech enzymu (viz dráhy 5 a 6 na obr. 9) nebyla zkoumána: ne všechny z nich jsou artefakty vzniklé díky velké dávce naneseného proteinu, nýbrž představují příbuzné proteiny. Nicméně antisérem vytvořené proti kvasinkovému enzymu lze použít k detekci a izolaci pozitivních klonů z hostitelských buněk transformovaných genovou bankou *M. smegmatis*. Podobně data týkající se aminokyselinové sekvence v tabulce 4 lze použít ke zkoumání sekvence izolovaného genu. Podobnosti týkající se imunologických reakcí a aminokyselinových sekvencí mezi enzymy kvasinky a *M. smegmatis* ukazují, že nukleotidové proby odvozené z genu TPS1 lze rovněž úspěšně použít k výběru genu *M. semagmatis*.

30 Závěrem lze říci, že imunologické a sekvenační studie enzymu *M. smegmatis* potvrzují, že Tre6Psyntázy různých organismů jsou členy jedné rodiny. Geny těchto enzymů lze použít stejným způsobem jako TPS1 k přípravě transgenních rostlin, které syntetizují trehalózu a mají zlepšenou toleranci ke stresu.

Seznam sekvencí

35

(1) Obecné informace

- (i) Přihlašovatelé: Alko Group Ltd.
and
40 Londesborough, John
Tunnela, Outi
Holmström, Kjell-Ove
Mäntylä, Einar
Welin, Björn
45 Mandal, Abul
Palva, E. Tapio

(ii) Název vynálezu: Rostlina transformovaná kódující sekvencí genu *Saccharomyces cerevisiae*

(iii) Počet sekvencí: 8

(iv) Korespondenční adresa:

(A) Adresát: Alko Group Ltd

(B) Ulice: Salmisaarenranta 7

(C) Město: Helsinki

(D) Stát: –

(E) Země: Finsko

(F) PSČ: FIN-00180

(v) Počítačová čtecí forma:

(A) Typ média: disketa, 3,5 palc., 720 kb

(B) Počítač: IBM PC/XT/AT

(C) Operační systém: PC-DOS

(D) Software: WP.1 soubor exportovaný jako DOS-ový textový soubor

(vi) Údaje o mezinárodní přihlášce:

(A) Číslo přihlášky: PCT/FI95/00377

(B) Datum podání: 29. červen 1995

(C) Třída: C12N 15/82, 15/54, A01H 5/00, A01N 3/00

(vii) Údaje o prioritní přihlášce:

(A) Číslo přihlášky: FI 943133

(B) Datum podání: 29. červen 1994

(2) Informace pro SEQ ID NO:1

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 13 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselinová

(D) Topologie: lineární

(ii) Molekulární typ: peptid

(iii) Hypotetický: ne

(iv) Typ fragmentu: N-koncový

(v) Popis sekvence: SEQ ID NO:1

Val Gly Ala Phe Pro Ile Ser Ile Asp Ser Ala Glu Leu

5

10

(2) Informace pro SEQ ID NO:2

- (i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 19 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselínová

(D) Topologie: lineární

- 10 (ii) Molekulární typ: peptid

- (iii) Hypotetický: ne

- (iv) Typ fragmentu: N-koncový

- (v) Popis sekvence: SEQ ID NO:2

Ala Xaa Phe Leu Asp Ala Leu Ala Ala Thr Gly Glu Thr Gly Asp Ser Gly Val Thr
5 10 15

(2) Informace pro SEQ ID NO:3

- (i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 9 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselinová

(D) Topologie: lineární

- 30 (ii) Molekulární typ: peptid

- (iii) Hypotetický: ano

- (iv) Typ fragmentu: N-koncový

- (v) Popis sekvence: SEQ ID NO:3

Arg Val Val Val Asn Asn Thr Ser Arg
5

(2) Informace pro SEQ ID NO:4

- (i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 6 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselinová

(D) Topologie: lineární

- 50 (ii) Molekulární typ: peptid

- (iii) Hypotetický: ano

- (iv) Typ fragmentu: N-koncový

(v) Popis sekvence: SEQ ID NO:4

Tyr Leu Glu Gly Ala Arg
5

5

(2) Informace pro SEQ ID NO:5

(i) Charakteristika sekvence:

10

- (A) Délka: 9 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselinová
- (D) Topologie: lineární

15

(ii) Molekulární typ: peptid

(iii) Hypotetický: ne

(iv) Typ fragmentu: N-koncový

20

(v) Popis sekvence: SEQ ID NO:5

Gln Val Leu Ala His Asp Val Asp Arg
5

25

(2) Informace pro SEQ ID NO:6

(i) Charakteristika sekvence:

30

- (A) Délka: 8 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselinová
- (D) Topologie: lineární

35

(ii) Molekulární typ: peptid

(iii) Hypotetický: ano

(iv) Typ fragmentu: N-koncový

40

(v) Popis sekvence: SEQ ID NO:6

Ile Gly Gly Ala Gln Pro Ala Asp
5

45

(2) Informace pro SEQ ID NO:7

(i) Charakteristika sekvence:

50

- (A) Délka: 8 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselinová
- (D) Topologie: lineární

55

(ii) Molekulární typ: peptid

(iii) Hypotetický: ano

(iv) Typ fragmentu: N–koncový

(v) Popis sekvence: SEQ ID NO:7

Val Gly Ala Leu Gln Val Leu Leu
5

(2) Informace pro SEQ ID NO:8

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 8 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselinová

(D) Topologie: lineární

(ii) Molekulární typ: peptid

(iii) Hypotetický: ne

(iv) Typ fragmentu: N–koncový

(v) Popis sekvence: SEQ ID NO:8

Gly Glu Val Gln Val Gly Phe Arg
5

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Rostlina transformovaná kódující sekvencí genu *Saccharomyces cerevisiae* pro trehalóza–6–fosfátsyntázu, který je pod kontrolou nekonstitutivního rostlinného promotoru, přičemž transformovaná rostlina má kapacitu pro syntézu trehalózy větší než je kapacita netransformované rostliny.

2. Rostlina podle nároku 1, přičemž rostlinný promotor je tkáňově specifický.

3. Rostlina podle nároku 1, přičemž rostlinný promotor je aktivován světlem.

4. Rostlina podle nároku 1, přičemž rostlinný promotor je aktivovatelný stresem, jako je vystavení suchu, vysoké salinitě nebo extrémním teplotám.

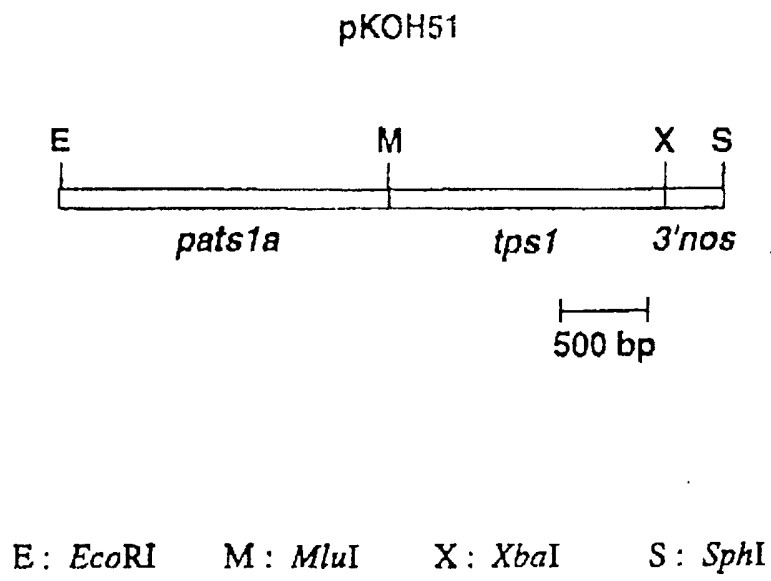
5. Rostlina podle kteréhokoli z nároků 1 až 4, přičemž gen pro trehalóza–6–fosfátsyntázu je mikrobiálního původu.

6. Rostlina podle nároku 5, přičemž gen pro trehalóza–6–fosfátsyntázu je kvasinkový gen TPS1.

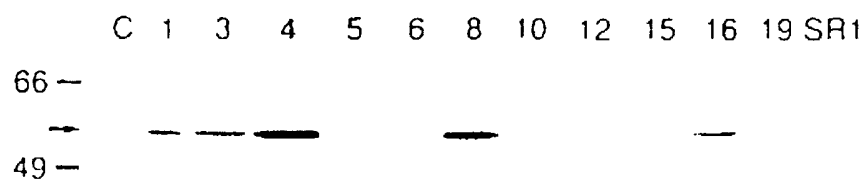
7. Rostlina podle kteréhokoli z nároků 1 až 6, přičemž tato rostlina je kotransformovaná alespoň jedním genem kódujícím trehalóza-6-fosfatázu nebo regulační subjednotku polypeptidu, který stabilizuje aktivitu vnesené trehalóza-6-fosfátsyntázy nebo trehalóza-6-fosfatázy.
- 5 8. Rostlina podle nároku 7, přičemž gen kódující trehalóza-6-fosfatáza je kvasinkový gen TPS2 a gen kódující regulační subjednotka polypeptidu je kvasinkový gen TSL1.
9. Rostlina podle nároku 6, přičemž rostlinný promotor je pats1A.
- 10 10. Rostlina podle kteréhokoli z nároků 1 až 8, přičemž použitý rostlinný promotor aktivovaný stresem je vybíraný z LTI78 nebo RAB18.
11. Rostlina podle kteréhokoli z nároků 1 až 10, přičemž tato rostlina je tolerantnější k účinku stresu než netransformovaná rostlina.
- 15 12. Rostlina podle kteréhokoli z nároků 1 až 11, přičemž tato rostlina je jednoděložná, vybíraná z kukuřice, ovsa, prosa, pšenice, rýže, ječmene, čiroku, laskavce, cibule, chřestu nebo cukrové třtiny.
- 20 13. Rostlina podle kteréhokoli z nároků 1 až 11, přičemž tato rostlina je dvouděložná, vybíraná z vojtěšky, sóji, petunie, bavlníku, cukrové řepy, slunečnice, mrkve, celeru, zelí, okurky, papriky, rajčete, bramboru, čočky, lnu, brokolice, tabáku, fazole, lociky, hlávkového salátu, řepky, kvěťáku, špenátu, růžičkové kapusty, artyčoku, hrachu, oky, ibišku jedlého, dýně-Cucurbita, kapusty kadeřavé, Brassica oleracea, čajovníku nebo kávovníku.
- 25 14. Použití rostliny podle kteréhokoli z nároků 1 až 13 pro produkci trehalózy.
15. Semeno produkované rostlinou podle kteréhokoli z nároků 1 až 13.

30

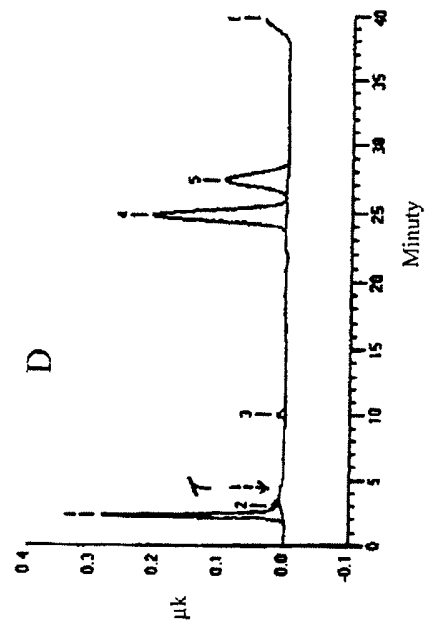
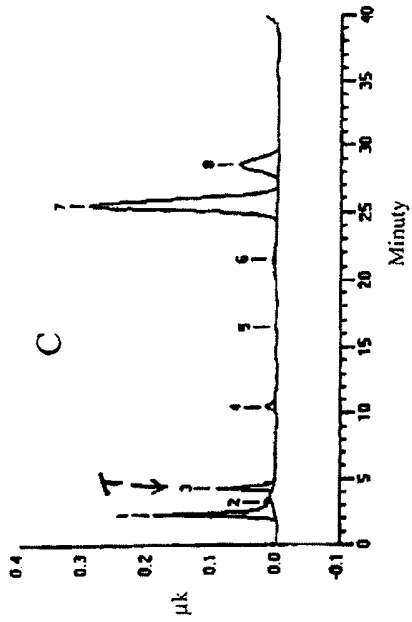
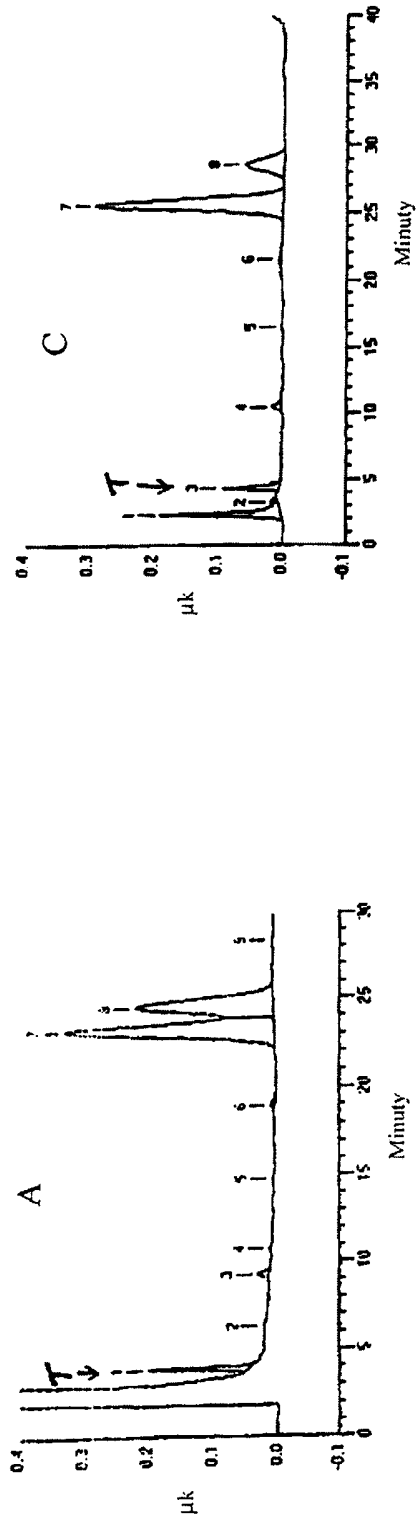
7 výkresů



Obr. 1



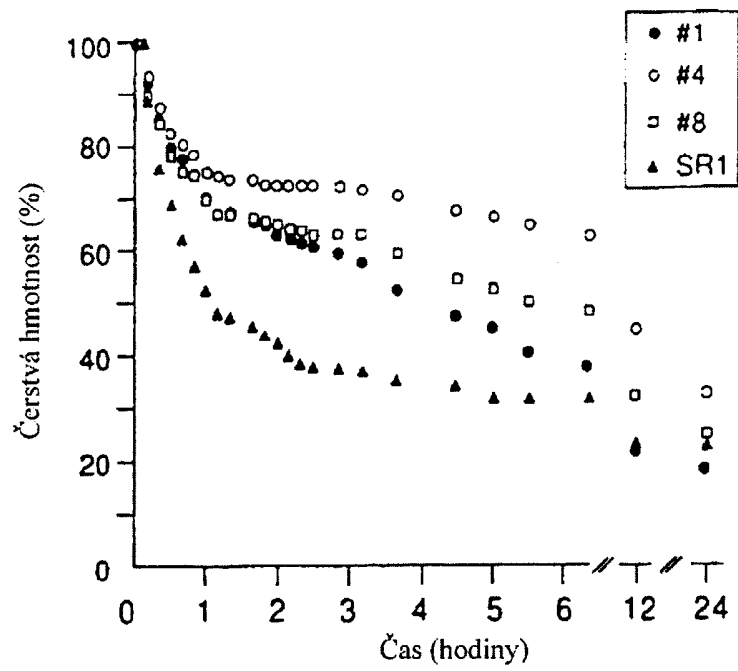
Obr. 2



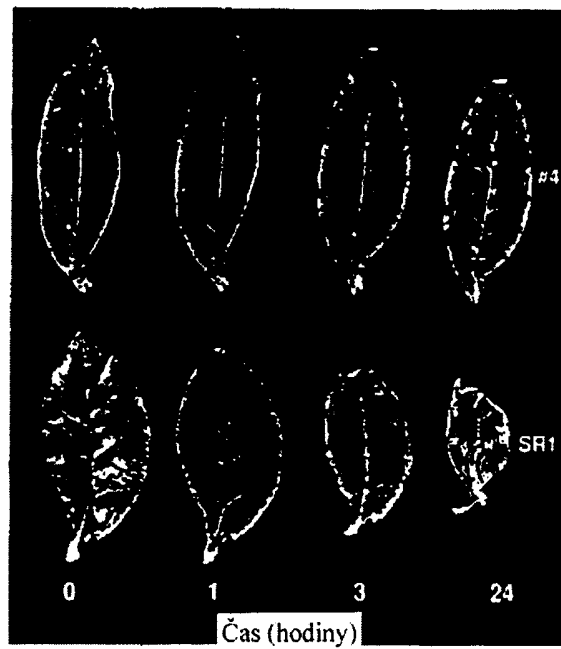
Obr. 3

FB	UL	ML	LL	US	LS	R	SR1	EC
1.9	2.8	1.3	1.0	nt	nt	0.26	0.06	
								

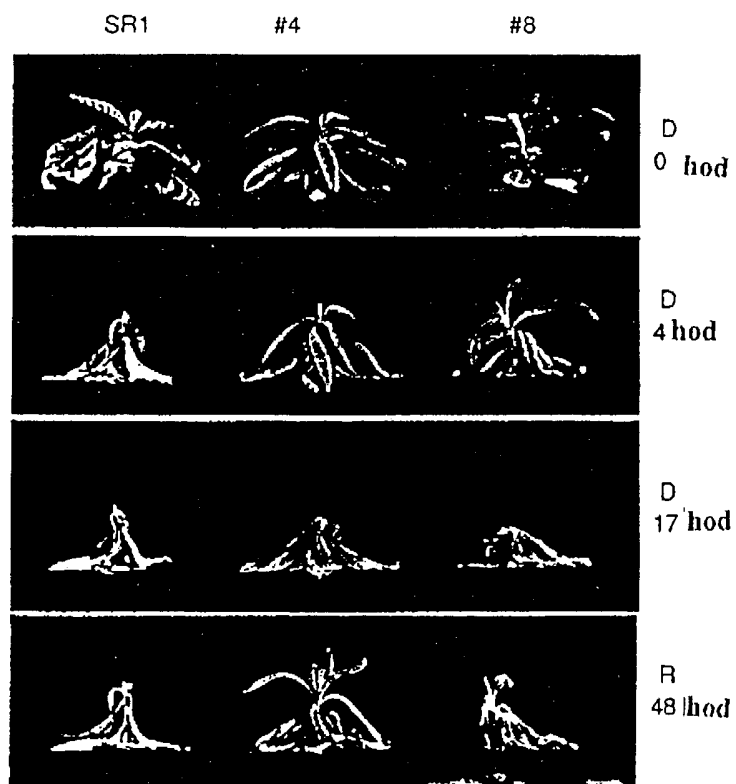
Obr. 4



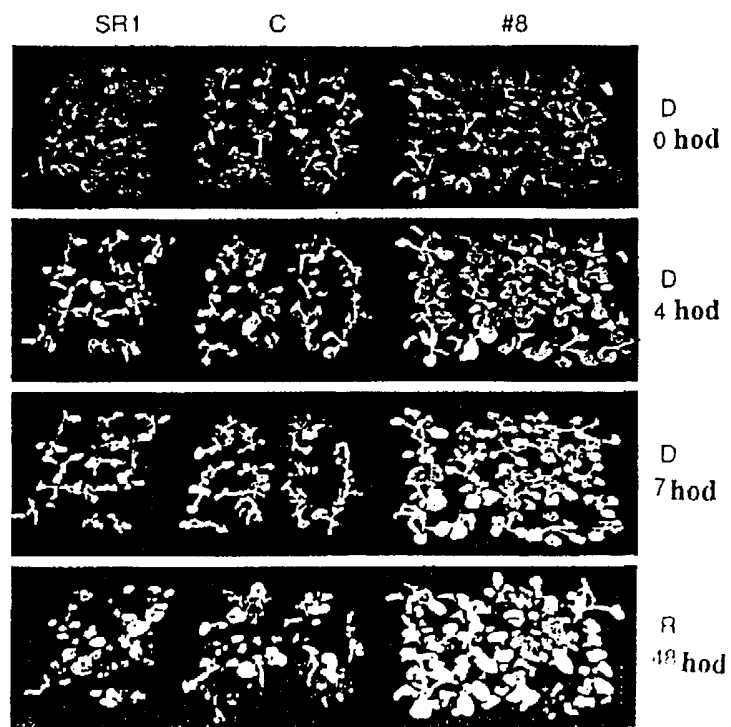
Obr. 5A



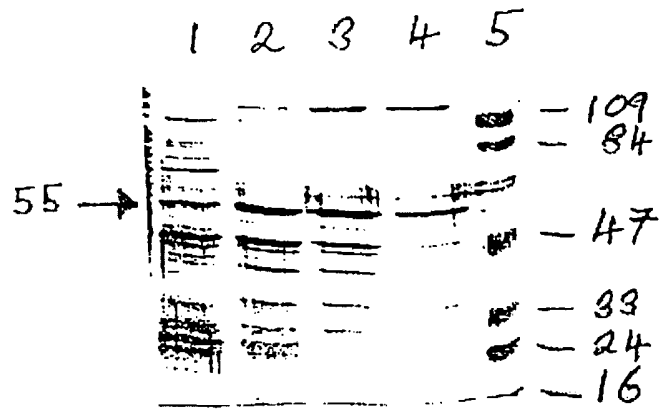
Obr. 5B



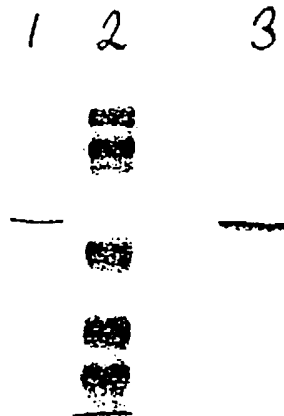
Obr. 6A



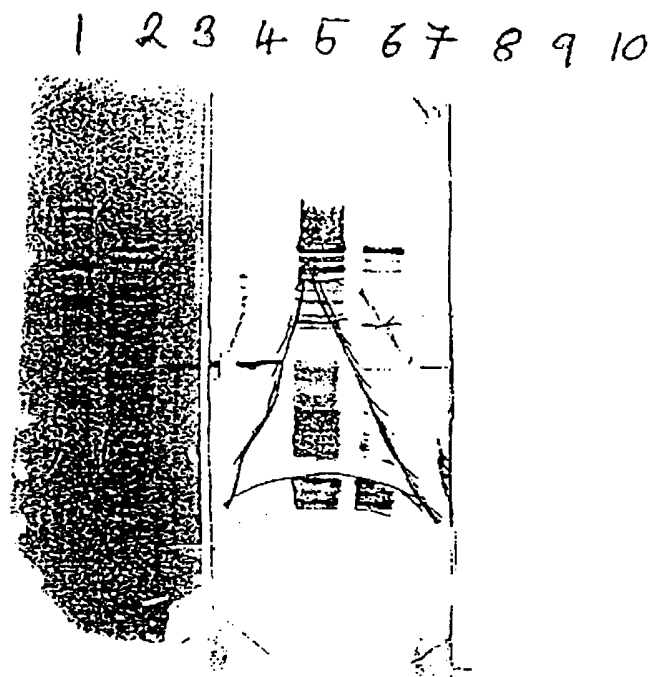
Obr. 6B



Obr. 7



Obr. 8



Obr. 9

poz. kontr.	9:3	9:2	9:1	6:4	6:3	6:2	6:1	1:1

Obr. 10

Konec dokumentu
