



(12) PATENT

(19) NO

(11) 326115

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

*C12N 9/88 (2006.01) A01H 5/00 (2006.01)*  
*C07K 14/415 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)*  
*C12N 1/15 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)*  
*C12N 1/21 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)*  
*C12N 5/10 (2006.01) C12R 1/19 (2006.01)*

Patentstyret

---

(21)	Søknadsnr	19974803	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1996.04.19 PCT/US96/05782
(22)	Inng.dag	1997.10.17	(85)	Videreføringsdag	1997.10.17
(24)	Løpedag	1996.04.19	(30)	Prioritet	1995.04.20, US, 426125 1995.05.31, US, 455355
(41)	Alm.tilgj	1997.12.19			
(45)	Meddelt	2008.09.29			
(73)	Innehaver	BASF Aktiengesellschaft, Carl-Bosch-Strasse 38, 67056 LUDWIGSHAFEN AM RHEIN, DE			
(72)	Oppfinner	Gerald W. Stockton, Yardley, PA, US Genichi Kakefuda, Yardley, PA, US Karl-Heinz Ott, Lawrenceville, NJ, US Jae-Gyu Kwagh, Fairless Hills, PA, US			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO			

---

(54)	Benevnelse	<b>Strukturbasert utforming og konstruksjon av varianter av acetohydroksyresyntase (AHAS) som er resistente overfor imidazolinoner og andre herbicider, AHAS inhiberende herbicider, selve AHAS varianter, DNA kodende for disse variantene, celler og frø som uttrykker disse variantene og fremgangsmåter for kontrollering av ugress.</b>			
(56)	Anførte publikasjoner	EP492113			
(57)	Sammendrag				

Det er beskrevet struktur-baserte moduleringsfremgangsmåter for fremstilling av acetohydroksyresyntase (AHAS) varianter, inkludert de som utviser selektivt øket motstand mot herbicider så som itniciazolirherbicider og AHAS inhiberende herbicider. Det er også beskrevet isolert DNA kodende for slike varianter, vektor som innbefatter DNA og fremgangsmåter for fremstilling av variantpolypeptidene og herbicidresistente planter inneholdende spesifikke AHAS genmutasjoner. Fremgangsmåter for kontroll av ugress i avlinger er også beskrevet.

Foreliggende oppfinnelse vedrører strukurbasert utforming og konstruksjon av varianter av acetohydroksyresyntase (AHAS) som er resistente overfor imidazolinoner og andre herbicider, AHAS inhiberende herbicider, selve AHAS varianter, DNA kodende for disse variantene, celler og frø som uttrykker disse variantene og fremgangsmåter for kontrollering av ugress.

Acetohydroksyresyntase (AHAS) er et enzym som katalyserer det innledende trinnet i biosyntesen til isoleucin, leucin og valin i bakterier, gjær og planter. For eksempel er moden AHAS fra *Zea Mays* omtrent et 599-aminosyreprotein som er lokalisert i kloroplasten (se figur 1). Enzymet anvender thiamin pyrofosfat (TPP) og flavin adenin dinukleotid (FAD) som kofaktorer og pyruvat som et substrat for å danne acetolaktat. Enzymet katalyserer også kondensasjonen av pyruvat og 2-ketobutyrat for å danne acetohydroksybutyrat. AHAS er også kjent som acetolaktatsyntase eller acetolaktatpyruvatlyase (karboksylerende) og er betegnet EC 4.1.3.18. Det aktive enzymet er sannsynligvis minst en homodimer. Ibdah et al. (*Protein Science*, 3:479-S. 1994), i et sammendrag, beskriver en modell for det aktive setet til AHAS.

En mengde herbicider inkluderer imidazolinon forbindelser så som imaxethapyr (PURSUIT® - American Cyanamid Company-Wayne, NJ), sulfonylurea-basert forbindelse så som sulfometuronmetyl (OUST® . E.I. du Pont de Nemours and Company-Wilmington, DE), triazolopyrimidinsulfonamider (Broadstrike™ - Dow Elanco, se Gerwick, et al., *Pestic. Sci.* 29:357-364, 1990), sulfamoylurea (Rodaway et al., *Mechanisms of Selectivity of Ac 322,140 i Paddy Rice, Wheat and Barley, Proceedings og the Brighton Crop Protection Conference-Weeds*, 1993), pyrimidyl-oksy-benzosyre (STABLE® - Kumiai Chemical Industry Company, E.I. du Pont de Nemours and Company; se *The Pesticide Manual 10th Ed.* s. 888-889, Clive Tomlin, Ed., British Crop Protection Council, 49 Downing Street, Farmham, Surrey G49 7PH, United Kingdom) og sulfonylkarboksamider (Alvarado et al., US-PS 4.883.914) virker ved å inhibere AHAS enzymatisk aktivitet (se Chaleff et al., *Science* 224:1443, 1984; LaRossa et al., *J. Biol. Chem.* 259:8753, 1984; Ray, *Plant Physiol.* 75:827, 11984; Shaner et al., *Plant Physiol.* 76:545, 1984). Disse herbicidene er meget effektive og miljømessig benigne. Deres anvendelse i jordbruk er derimot begrenset av deres mangel på selektivitet på grunn av at avlinger samt uønsket ugress er følsomme overfor phytotoksiske effekter til disse herbicidene.

35

EP 492113 beskriver nær beslektet teknikk, men beskriver ikke en tre-dimensjonal modell for utvelgelse av posisjoner for mutagenesen.

Bedbrook et al., US-PS 5.013.659, 5.141.870 og 5.378.824, beskriver flere sulfonyl-urearesistente AHAS varianter. Disse variantene ble enten oppnådd ved mutagenese av planter, frø eller celler og selektering for herbicid-resistente mutanter, eller ble oppnådd fra slike mutanter. Denne metoden er upålitelig på grunn av at den bygger på (i det minste delvis) tilfeldig sjanse for introduisering av en relevant mutasjon, i stedet for en rasjonell konstruksjonsmetode basert på en strukturell modell av målproteinet.

Det er fortsatt et behov innenfor fagområdet for fremgangsmåter og sammensetninger som tilveiebringer selektivt bredspektret og/eller spesifikk herbicid motstand i dyrkede avlinger. Foreliggende oppfinnere har oppdaget at selektive herbicidresistente variantformer av AHAS og planter inneholdende disse kan bli dannet ved strukturbasert utforming av AHAS overfor pyruvat oksydase (POX), som identifiserer en herbicid bindingslomme eller lommer på AHAS modellen, og konstruering av spesifikke mutasjoner som endrer affiniteten av herbicidet for bindingslommen. Disse variantene og plantene blir ikke inhibert eller drept av en eller flere klasser av herbicider og har beholdt tilstrekkelig AHAS enzymatisk aktivitet for å understøtte vekst av avling.

#### Kort beskrivelse av tegningene

Figur 1 er en illustrasjon av en 600 aminosyre lang sekvens som tilsvarer omtrent 599 aminosyresekvensen til acetohydroksyresyntase (AHAS) fra Zea Mays som er gitt som et eksempel på et plante AHAS enzym. Sekvensen innbefatter ikke en transitt sekvens, og ekstraglycin er rudimentær fra et trombinspaltningssete. Residiene Met53, Arg128 og Phe135 er vist i uthevet tilstand.

Figur 2 er en illustrasjon på oppstilling av sekvensen til mais AHAS og pyruvat oksidase (POX) fra *Lactobacillus planarum*.

Figur 3 er en skjematisk representasjon av den sekundære strukturen til en AHAS subenhet. Regulære sekundære strukturelementer,  $\alpha$ -heliks og  $\beta$ -arkstruktur, er vist som sirkler og ellipser, og er nummerert separat for hver av de tre domenene innenfor en subenhet. Løkker og ringregioner er representert ved svarte linjer, med nummeret som representerer omtrentlige begynnelser og ender til elementene. Beliggenhetene til kofaktorbindingssetene og kjente mutasjonsseter er indikert med henholdsvis oktahedroner og stjerner.

Figur 4 er en illustrasjon av en data-dannet modell av det aktive setet til mais AHAS med imazethapyr (PURSUIT® herbicid) modellert inn i bindingslommen.

Figur 5 er en illustrasjon av homologien blant AHAS aminosyresekvensene avledet fra forskjellige plantearter. pAC 751 er mais 2 AHAS isozym som uttrykt fra pAC 751 E. coli ekspresjonsvektoren som i figur 1; Mais 2 er mais 2 AHAS isozymet; Mais 1 er mais 1 AHAS isozymet; Tobac 1 er en tobacco AHAS SuRA isozymet; Tobaz 2 er tobacco AHAS SuRB isozymet; Athcsr 12 er *Aeabidopsis thaliana* Csr 1.2 AHAS gener; Bnaal 3 er *Brassica napus* AHAS III isozym; og Bnaal 2 er *Brassica napus* AHAS II isozymete.

pAC 751 og mais 2 er identiske gener med unntagelse av at mais 2 begynner ved begynnelsen av transittsekvensen og pAC 751 begynner ved det antatte modne N-terminale setet med en ytterligere glycin ved den N-terminale enden til trombin gjenkjenningsekvensen i pGEX-2T ekspresjonsvektoren. N-terminal glycin er ikke en naturlig aminosyre i den posisjonen.

Aminosyresekvens oppstillingene til AHAS proteinene er blitt utført av PILEUP (GCG Package - Genetics Computer Group, Inc., University Research Park - Madison-WI). Konsensussekvensen ble dannet av PRETTY GCG Package.

Figur 6 er en fotografisk illustrasjon av en SDS-polyakrylamidgel farget for protein som viser rensing av mais AHAS. Kolonnen inneholder (fra venstre til høyre): A, molekylvektmarkører; B, rå E. coli celleekstrakt; C, glutation-agarose affinitetsrenset preparat; D, trombinspaltning av affinitets renset preparat; E, andre føring gjennom glutation-agarose kolonne og Sephacryl S-100 gelfiltrering.

Figur 7 er en grafisk illustrasjon av resultatene til in vitro analyser av enzymatisk aktivitet til vill-type og mutante AHAS proteiner i fravær og i nærvær av økte konsentrasjoner av imazethapyr (PURSUIT® herbicid). Y-aksen representerer aktivitetsprosenten til mutant enzym, hvori 100% verdien blir målt i fravær av inhibitor.

Figur 8 er en grafisk illustrasjon av resultatene til in vitro analyser av enzymatisk aktivitet til vill-type og mutante AHAS proteiner i fravær og nærvær av økte konsentrasjoner sulfometuronmetyl (OUST® herbicid). Y-aksen representerer prosent aktivitet til mutant enzym, hvori 100% verdien blir målt i fravær av inhibitor.

Figur 9 er en grafisk illustrasjon av in vitro analyser av enzymatisk aktivitet til vill-type *Arabidopsis* AHAS protein og Met124Ile mutant *Arabidopsis* AHAS protein i nærvær og fravær av økende konsentrasjoner imazethapyr (PURSUIT® herbicid) og sulfometu-

ronmetyl (OUST® herbicid). Y-aksen representerer prosent aktivitet til det mutante enzymet, hvori 100% verdien blir målt i fravær av inhibitor.

Figur 10 er en grafisk illustrasjon av in vitro analyser av den enzymatiske aktiviteten til vill-type Arabidopsis AHAS protein og Met124His mutant Arabidopsis AHAS proteinet i fravær og nærvær av økende konsentrasjoner imazethapyr (PURSUIT® hebicide) og sulfometuronmetyl (OUST® herbicide). Y-aksen representerer prosent aktivitet av det mutante enzymet, hvori 100% verdien blir målt i fravær av inhibitor.

Figur 11 er en grafisk illustrasjon av in vitro analyser av den enzymatiske aktiviteten til vill-type Arabidopsis AHAS protein og Arg199Glu mutant Arabidopsis AHAS protein i fravær og nærvær av økende konsentrasjoner imazethapyr (PURSUIT® herbicide) og sulfometuronmetyl (OUST® herbicide). Y-aksen representerer prosent aktivitet til det mutante enzymet, hvori 100% verdien blir målt i fravær av inhibitor.

Figur 12 er en skjematisk illustrasjon av en DNA vektor anvendt for plantetransformasjon, som inneholder nptII gen (kodende for kanamycin resistens) under kontroll av 35S promoteren og et AHAS gen (vill type eller variant) under kontroll av Arabidopsis AHAS promoteren.

Figur 13 er et fotografi som viser rotutviklingen til tobakkplanter transformert med Arabidopsis AHAS genet inneholdende enten Met124Ile eller Arg199Glu mutasjon og en ikke-transformert kontroll. Planter ble dyrket i 18 dager etter overføring inn i medium inneholdende 0,25 µm imazethapyr.

Figur 14 er et fotografi som viser tobakkplanter som formert med Arabidopsis AHAS genet inneholdende enten Met124Ile, Met 124His eller Arg199Glu mutasjon og en ikke-transformert kontroll, som var blitt sprayet med to ganger feltraten (100 g/ha) av imazethapyr.

Figur 15 er et fotografi som viser resultatene fra spiringstester utført i nærvær av herbicide CL 299,263 (imazamox), som ble utført på frø høstet fra primære tobakkplantetransformanter som var blitt transformert med Arabidopsis AHAS genet inneholdende enten Met124Ile, Met 124His eller Arg199Glu mutasjon.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en struktur-basert utformingsmetode for produksjon av herbicidresistent AHAS variant protein. Fremgangsmåten innbefatter:

- (a) oppstilling av et mål AHAS-protein på puryvat oksidasetemplant for å avlede den tredimensjonale strukturen til nevnte mål-AHAS-protein;
- (b) utforming av en eller flere imidazolinon- og/eller sulfonyleureabaserte herbicider inn i den nevnte tre-dimensjonale strukturen for å lokalisere en imidazolinon- og/eller sulfonyleureabasert herbicidbindingslomme i nevnte mål-AHAS-protein;
- (c) utvelgelse som et mål for en mutasjon en aminosyreposisjon i nevnte mål-AHAS-protein, der nevnte mutasjon endrer affiniteten til minst et imidazolinon- og/eller sulfonyleureabasert herbicid for nevnte bindingslomme;
- (d) mutering av DNA som koder for nevnte mål-AHAS-protein for å fremstille et mutert DNA som koder for en variant-AHAS inneholdende nevnte mutasjon i nevnte posisjon; og
- (e) uttrykking av nevnte muterte DNA i en første celle, under betingelser hvor nevnte variant-AHAS inneholdende nevnte mutasjon i nevnte posisjon blir produsert.

15

Fremgangsmåten kan videre innbefatte:

- (f) uttrykking av DNA som koder for vill-type-AHAS parallelt i en andre celle;
- (g) rensing av nevnte vill-type- og nevnte variant-AHAS-proteiner fra nevnte celler;
- (h) analysering av nevnte vill-type- og nevnte variant-AHAS-proteiner for katalytisk aktivitet ved omdanning av puryvat til acetolaktat eller ved kondensering av pyruvat og 2-ketobutyrat for å danne acetohydroksybutyrat, i fravær og i nærvær av nevnte imidazolinon- eller sulfonyleureabaserte herbicid; og
- (i) gjentagelse av trinnene (c)-(h), hvori nevnte DNA kodende for nevnte variant ifølge trinn (e) blir anvendt som AHAS-kodende DNA i trinn (c) helt til et imidazolinon-trinn (e) blir anvendt som AHAS-kodende DNA i trinn (c) helt til et imidazolinon- eller sulfonyleureabasert herbicidresistent AHAS-variantprotein er identifisert som har:
  - (i) i fravær av nevnte imidazolinon- eller sulfonyleureabaserte herbicid,
    - (a) en katalytisk aktivitet som alene er tilstrekkelig for å opprettholde levedyktigheten til en celle hvori den blir uttrykt; eller
    - (b) katalytisk aktivitet i kombinasjon med et hvilket som helst imidazolinon- eller sulfonyleureabasert herbicidresistent AHAS-variantprotein som også blir uttrykt i nevnte celle, som kan være den samme eller forskjellig fra nevnte første AHAS-variant-protein, tilstrekkelig for å opprettholde levedyktigheten til en celle som den blir uttrykt i; hvori nevnte celle krever AHAS-aktivitet for levedyktighet; og

35

- (ii) katalytisk aktivitet som er mer resistent overfor minst et imidazolinon- eller sulfonylurea herbicid enn vill-type-AHAS.

I en foretrukket utførelsesform omfatter fremgangsmåten at nevnte katalytiske aktivitet i  
5 fravær av et imidazolinon- eller sulfonylureabasert herbicid er mer enn 20% av den katalytiske aktiviteten til nevnte vill-type-AHAS i fravær av et imidazolinon- eller sulfonylureabasert herbicid.

I en foretrukket utførelsesform omfatter herbicidet et imidazolinonherbicid og nevnte  
10 herbicidresistente AHAS-variantprotein har:

- (i) katalytisk aktivitet i fravær av nevnte herbicid på mer enn omtrent 20% av den katalytiske aktiviteten i nevnte vill-type-AHAS;
- (ii) katalytisk aktivitet som er mer resistent overfor tilstedeværelse av  
15 imidazolinon herbicider sammenlignet med vill-type-AHAS; og
- (iii) katalytisk aktivitet som er mer sensitiv overfor tilstedeværelse av sulfonylureaherbicider sammenlignet med imidazolinonherbicider.

Det er foretrukket at nevnte mål-AHAS-protein er avledet fra *Arabidopsis thaliana*.  
20

Det er videre foretrukket at nevnte første celle er *E.coli* eller at nevnte første og andre celler er *E.coli*.

Det er videre foretrukket at nevnte mål-AHAS-protein omfatter et protein med  
25 sekvensen SEQ ID No.1 eller aminosyresekvensen til et annet plante-AHAS-protein.

Det er videre foretrukket at nevnte mutasjon er en substitusjon av minst en forskjellig aminosyrerest ved en aminosyrerest ifølge sekvensen vist i SEQ ID No.1 utvalgt fra gruppen bestående av F135, M53, R128 og en aminosyrerest fra et annet plante-AHAS-  
30 protein ved en aminosyre oppstilt med en hvilken som helst av de foregående, og en hvilken som helst kombinasjon av en hvilken som helst av de foregående.

Det er videre foretrukket at nevnte substitusjon blir valgt fra gruppen bestående av Met53Trp, Met53Glu, Met53Ile, Met53His, Arg128Ala, Arg128Glu, Phe135Arg eller  
35 en kombinasjon av hvilke som helst av de foregående.

Ovennevnte modifikasjoner er rettet mot endring av evnen som et herbicid, og fortrinnsvis et imidazolinon-basert herbicid, har til å inhibere den enzymatiske aktiviteten til proteinet.

- 5 Foreliggende oppfinnelse angår videre isolert DNA kodende for et acetohydroksysyresyntase (AHAS)-variantprotein, kjennetegnet ved at variantproteinet omfatter et AHAS-protein modifisert ved substitusjon at minst en forskjellig aminosyrerest ved en aminosyrerest i sekvensen vist i SEQ ID No.1 utvalgt fra gruppen bestående av M53, R128, F135 og en hvilken som helst kombinasjon av hvilke som helst av de foregående.

10

En foretrukket utførelsesform omfatter DNA ifølge oppfinnelsen kjennetegnet ved at modifiseringen endrer evnen et imidazolinon- og/eller sulfonyleureabasert herbicid har til å inhibere den enzymatiske aktiviteten til nevnte protein. En foretrukket utførelsesform omfatter DNA ifølge oppfinnelsen kjennetegnet ved at nevnte AHAS-protein er avledet fra *Arabidopsis thaliana*. En foretrukket utførelsesform omfatter DNA ifølge oppfinnelsen kjennetegnet ved at nevnte substitusjon blir valgt fra gruppen bestående av Met53Trp, Met53Glu, Met53Ile, Met53His, Arg128Ala, Arg128Glu, Phe135Arg, eller en kombinasjon av hvilke som helst av de foregående.

15

- 20 En foretrukket utførelsesform omfatter DNA ifølge oppfinnelsen kjennetegnet ved at nevnte variant-AHAS-protein har,  
i fravær av minst et imidazolinon- eller sulfonyleureabasert AHAS- inhiberende herbicid,

- (i) en katalytisk aktivitet som alene er tilstrekkelig for å opprettholde levedyktigheten til en celle hvori det blir uttrykt; eller  
25 (ii) katalytisk aktivitet i kombinasjon med et hvilket som helst annet imidazolinon- eller sulfonyleureabasert herbicidresistent AHAS-variantprotein som også blir uttrykt i nevnte celle, som kan være det samme som eller forskjellig fra nevnte AHAS-variantprotein,  
30 tilstrekkelig for å opprettholde levedyktigheten til en celle som den det blir uttrykt i;  
hvori nevnte celle krever AHAS-aktivitet for levedyktighet; og  
(iii) katalytisk aktivitet som er mer resistent overfor minst et imidazolinon- eller sulfonyleureabasert herbicid eller vill-type-AHAS.

35

En foretrukket utførelsesform omfatter DNA ifølge oppfinnelsen kjennetegnet ved at nevnte variant-AHAS har mer enn 20% av den katalytiske aktiviteten til vill-type-

AHAS. En foretrukket utførelsesform omfatter DNA ifølge oppfinnelsen kjennetegnet ved at nevnte variant-AHAS er mer resistent overfor imidazolinonbaserte herbicider enn ovenfor sulfonylureabaserte herbicider. I en foretrukket utførelsesform koder isolert DNA for en herbicid-resistent variant av AHAS.

5

Det er også tilveiebrakt DNA vektorer omfattende DNA kodende for disse AHAS variantene, selve variant AHAS proteinene og celler, dyrket enten in vivo eller i cellekultur, som uttrykker AHAS variantene eller omfatter disse vektorene.

- 10 I et annet aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for å gi herbicidresistens til en celle eller celler og spesielt en plantecelle eller celler så som for eksempel et frø. Oppfinnelsen angår således en fremgangsmåte for å frembringe imidazolinon- og/eller sulfonylureabasert herbicidresistens i en celle kjennetegnet ved at den omfatter: (a) kloning av et DNA som definert ifølge oppfinnelsen inn i en
- 15 kompatibel ekspresjonsvektor; og (b) transformering av nevnte DNA inn i nevnte celle, under betingelser hvori nevnte gen blir uttrykt i tilstrekkelige nivåer for å utvise herbicidresistens på nevnte celle. En foretrukket utførelsesform omfatter en fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen kjennetegnet ved at nevnte muterte gen koder for en annen aminosyre i minst en av posisjonene 53, 128, 135 eller kombinasjoner derav. Et
- 20 AHAS gen, fortrinnsvis Arabidopsis thaliana AHAS genet, er mutert for å endre evnen som et herbicid har til å inhibere den enzymatiske aktiviteten til AHAS. Det mutante genet ble klonet inn i en kompatibel ekspresjonsvektor, og genet blir transformert inn i en herbicid-sensitiv celle under betingelser hvori det blir uttrykt ved tilstrekkelige nivåer for å utvise herbicid resistens på cellen.

25

- Også beskrevet er fremgangsmåter for ugresskontroll, hvori en avling inneholdende et herbicid resistent AHAS gen ifølge foreliggende oppfinnelse blir dyrket og behandlet med en ugress-kontrollert effektiv mengde herbicid. Foreliggende oppfinnelse angår således en fremgangsmåte for å kontrollere ugress i en avling kjennetegnet ved at den
- 30 omfatter dyrking av en avling omfattende imidazolinon- og/eller sulfonylureabaserte herbicidresistente planter omfattende celler som definert ifølge oppfinnelsen, og behandling av nevnte avling med nevnte imidazolinon- og/eller sulfonylureabasert herbicid. Foreliggende oppfinnelsen angår således også en fremgangsmåte for å kontrollere ugress i en avling kjennetegnet ved at den omfatter dyrking av en avling
- 35 omfattende imidazolinon- og/eller sulfonylureabaserte herbicidresistente planter omfattende celler som definert ifølge oppfinnelsen, og behandling av nevnte avling med

nevnte imidazolinon- og/eller sulfonylureabaserte herbicidsammensetning inkludert nevnte herbicid.

Det er foretrukket i hver fremgangsmåte at det første herbicidet inneholder minst en funksjonell gruppe som reagerer med en funksjonell gruppe i bindingslommen.

Foreliggende oppfinnelse omfatter rasjonell konstruksjon eller strukturbasert molekylær utforming av modifiserte versjoner av enzymet AHAS og AHAS inhiberende herbicider. Disse modifiserte enzymene (AHAS variant proteinene) er motstandsdyktig overfor virkningen av herbicider. Foreliggende oppfinnelsen omfatter også DNA som koder for disse variantene, vektorer som innbefatter disse DNA, AHAS variantproteiner og celler som uttrykker disse variantene. I tillegg er det tilveiebrakt fremgangsmåte for å produsere herbicidmotstand i planter ved å uttrykke disse variantene og fremgangsmåter for ugresskontroll. DNA og AHAS variantene ifølge foreliggende oppfinnelse ble oppdaget i studier som var basert på molekylær utforming av strukturen til AHAS.

#### Rasjonell strukturbasert konstruksjon av AHAS varianter og AHAS inhiberende herbicider.

Herbicidresistente varianter av AHAS ifølge foreliggende oppfinnelse er nyttige for å tilveiebringe herbicidresistens i planter og kan bli konstruert med POX modellen, AHAS modellen, eller funksjonelle ekvivalenter derav, så som for eksempel transketolaser, karboligaser, puryvatdekarboksylase, proteiner som binder FAD og/eller TPP som en kofaktor, eller hvilke som helst proteiner som har strukturelle likheter med POX og/eller AHAS; med en AHAS modell så som en modell som har sekvensen ifølge figur 1; eller med en funksjonell ekvivalent av sekvensen ifølge figur 1 inkludert en variant utformet fra en tidligere modell. Proteiner som kan bli anvendt innbefatter hvilke som helst av proteinene som har mindre enn et gjennomsnittlig kvadratrotavvik ("root mean square deviation") på mindre enn 3,5 ångstrom i deres C $\alpha$  karboner i forhold til hvilke som helst av ovennevnte molekyler. AHAS rettede herbicider kan bli likeledes utformet fra disse templatene. En funksjonell ekvivalent av en AHAS aminosyresekvens er en sekvens med romlig, dvs. 60-70%, homologi, spesielt i konserverte regioner så som for eksempel, en antatt bindingslomme. Homologigraden kan bli bestemt ved enkel oppstilling basert på programmer kjent innenfor fagområdet, så som for eksempel GAP og PILEUP ifølge GCG. Homologi betyr identiske aminosyrer eller konservative substitusjoner. En funksjonell ekvivalent av et bestemt aminosyreresidie i AHAS proteinet ifølge figur 1 er et aminosyreresidie av et annet AHAS protein som når oppstilt med

sekvensen i figur 1 ifølge programmer kjent innenfor fagområdet, så som for eksempel, GAP og PILEUP til GCG, er i samme posisjonen som aminosyreresidiet i figur 1.

- Rasjonelle konstruksjonstrinn innbefatter vanligvis: (1) oppstilling av et mål AHAS protein med en POX skjelett eller struktur eller et AHAS skjelett eller en struktur; (2) eventuelt, og dersom AHAS skjelettet har en identifisert herbicid bindingslomme, utforming av en eller flere herbicider til den tre-dimensjonale struktur for å lokalisere en herbicidbindende lomme i målprotein; (3) seleksjon av et mutasjon basert på modellen; (4) sete-rettet mutagenese; og (5) ekspresjon og rensing av varianter.
- 10 Ytterligere trekk kan innbefatte (6) analysing av enzymatiske egenskaper og (7) vurdering av egnede varianter ved sammenligning med egenskapene til vill-type AHAS. Hvert trinn er diskutert separat nedenfor.

#### 1. Molekylær utforming

- 15 Molekylær utforming (og spesielt protein homologi utforming) teknikker kan tilveiebringe en forståelse for strukturen og aktiviteten til et gitt protein. Den strukturelle modellen til et protein kan bli bestemt direkte fra eksperimentelle data så som røntgenkrystallografi, indirekte ved homologiutforming eller lignende, eller kombinasjoner derav (se White, et al., Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 23:349, 1994).
- 20 Bestemmelse av den tre-dimensjonale strukturen til AHAS tilveiebringer grunnlaget for utvikling av et rasjonelt skjema for mutasjon av bestemte aminosyreresidier innenfor AHAS som tilveiebringer herbicidresistens til polypeptidet.

- Molekylær utforming av strukturen til Zea mais AHAS, ved anvendelse som et templat den kjente røntgen krystalstrukturen til beslektet pyruvatoksidase (POX) fra Lactobacillus plantarum, tilveiebringer en tre-dimensjonal modell på AHAS struktur som er nyttig for konstruering av herbicid-resistente AHAS varianter eller AHAS inhiberende herbicider. Denne utformingsprosedyren drar nytte av det faktum at AHAS og POX har et antall biokjemiske karaktertrekk felles og kan bli avledet fra et felles opphavsgen
- 30 (Chang et al., J. Bacteriol. 170:3937, 1988).

På grunn av høy grad av homologi mellom ulike arter i AHAS kan modellert AHAS beskrevet her eller funksjonelle ekvivalenter derav også bli anvendt som templater for AHAS variantproteinkonstruksjon.

35

Derivasjon av en modell ved anvendelse av interaktiv molekylær grafikk og oppstilling er beskrevet i detalj nedenfor. Tre-dimensjonal AHAS struktur som er et resultat av

denne prosedyren forutsier den approksimate romlige organisasjon av det aktive setet til enzymet og bindingssetet eller lommen til inhibitorene så som herbicider som inkluderer, men ikke begrenset til, imidazolinonherbicider. Modellen blir deretter forbedret og tolket basert på biokjemiske studier som også er beskrevet nedenfor.

5

Proteinhomologi utforming krever oppstilling av den primære sekvensen til proteinet som studeres med et andre protein hvor krystallstrukturen er kjent. Pyruvatoksidase (POX) ble valgt fra AHAS homologimodulering på grunn av at POX og AHAS har et antall felles biokjemiske karaktertrekk. For eksempel har både AHAS og POX felles

10

aspekter når det gjelder enzymatiske reaksjonsmekanismer, samt kofaktor og metallkrav. I begge enzymene er tiaminpyrofosfat (TPP), flavinadenindinukleotid (FAD) og et divalent kation nødvendig for enzymatisk aktivitet. FAD formidler en redoksreaksjon iløpet av katalytiske analyser i POX, men har sannsynligvis bare en strukturell funksjon i AHAS, som sannsynligvis er en rudimentær rest fra utvikling av AHAS fra POX.

15

Begge enzymene anvender pyruvat som et substrat og danner hydroksyletyltiamin pyrofosfat som et stabilt reaksjonsmellomprodukt (Schloss, J.V. et al. In Biosynthesis of branched chain amino acids, Barak, Z.J.M., Chipman, D.M., Schloss, J.V. (eds) VCH Publishers, Weinheim, Germany, 1990).

20

I tillegg er AHAS aktiviteten tilstede i kimære POX-AHAS proteiner bestående av den N-terminale halvdel av POX og den C-terminale halvdel av AHAS, og det er en liten grad av AHAS aktivitet utvist av POX alene. AHAS og POX utviser også lignende egenskaper i oppløsning (Risse, B. et al., Protein Sci. 1: 1699 og 1710, 1992; Singh, B.K., & Schmitt, G.K. (1989), FEBS Letters, 258: 113; Singh, B.K. et al. (1989) In:

25

Prospects for Amino Acid Biosynthesis Inhibitors in Crop Protection and Pharmaceutical Chemistry, (Lopping, L.G., et al., eds., BCPC Monograph s. 87). Med øket proteinonsentrasjon gjennomgår både POX og AHAS trinnvise omdanninger fra monomerer til dimerer og tetramerer. Økninger i FAD konsentrasjonen inducerer også høyere ordener av subenhetoppstillingen. Den tetramere formen av begge proteinene er mest stabil

30

overfor varme og kjemiske denaturering.

Krystallstrukturen til POX fra *Lactobacillus planarium* er blitt bestemt av Muller et al., Science 259:965, 1993. Foreliggende oppfinnere har oppdaget at basert delvis på grad av fysisk, biokjemisk og genetisk homologi mellom AHAS og POX, bør røntgenkrystallstrukturen til POX bli anvendt som et strukturelt utgangspunkt for homologiutforming av AHAS-strukturen.

35

- AHAS og *L. plantarum* POX sekvenser var ikke like nok for en fullstendig databasert oppstilling. Bare omtrent 20% av aminosyrene er identiske, mens omtrent 50% av residiene er fra lignende klasse (dvs. sure, basiske, aromatiske og lignende). Dersom sekvensene blir sammenlignet med hensyn på hydrofile og hydrofobe residieklassifiseringer blir over 500 av 600 aminosyrer parret. Sekundære strukturantagelser for AHAS (Holley et al., Proc. Natl.Acad.Sci.USA 86:152 1989) viste en sterk likhet med den virkelige sekundære strukturen til POX. For nesten 70% av residiene samsvarer antatt AHAS sekundær struktur den til POX.
- 10 POX monomerer består av tre domener som alle har et sentralt, parallelt  $\beta$ -ark med overkrysninger bestående av  $\alpha$ -helikser og lange løkker. (Muller et al., Science 259: 965, 1993). Topologien til arkene er forskjellig i domenene, dvs. i første og tredje domenerer trådene oppstilt i  $\beta$ -ark i sekvensen 2-1-3-4-6-5, mens i  $\beta$ -arket til den andre domenen er sekvensen 3-2-1-4-5-6.
- 15 Datadannede oppstillinger var basert på sekundærstrukturantagelser og sekvenshomologi. Konvensjonell par-vis sekvensoppstillingsmetoden beskrevet av Needleman and Wunch, J. Mol. Biol. 48: 443, 1970, ble anvendt. To sekvenser ble oppstilt for å maksimalisere oppstillingsscoringen. Oppstillingsscoring (homologiscoring) er summen av
- 20 scoringer for alle par av oppstilte residier, pluss en valgfri straff for innføring av GAP i oppstillingen. Scoringen for oppstilling av et par residier er en tabulert tallverdi. Homologiscoringssystemet er basert på observering av divergensfrekvensen mellom et gitt residiepar. (MO Dayhoff, RM Schwartz & BC Orcutt "Atlas of Protein Sequence and Sturcture" vol. 5. suppl. 3 s. 345-362, 1978).
- 25 Oppstillingene ble ytterligere forbedret ved reposisjonering av GAP for å konservere kontinuerlige regulære sekundære strukturer. Aminosyresubstitusjoner dannet ved vurdering av sannsynlige oppstillingsskjemaer ble sammenlignet ved hjelp av interaktiv molekylær grafikk. Oppstillinger med de mest konservative substitusjonene med hensyn
- 30 til den bestemte funksjonaliteten til aminosyrene innenfor et gitt sete ble valgt. Den endelige oppstillingen av både POX og AHAS er vist i figur 2. Konserverte opphopninger av residier ble identifisert, spesielt for TPP bindingssetet og for deler av FAD bindingssetet. Oppstillingen viste en høy likhet mellom AHAS og POX for den første domenen, for de fleste delene av den andre domenen, og for omtrent halvparten av den
- 35 tredje domenen. Det meste av regionene som ble dårlig oppstilt og kan bli foldet på annen måte i POX og i AHAS var ventet å være på overflaten av proteinet og var ikke

involvert i kofaktor eller inhibitorbinding. Bestemmelse av mutasjons seter blir ikke vesentlig påvirket av små skift i oppstillingen.

De fleste TPP bindingsresidene er sterkt konserverte mellom POX og AHAS (for eksempel P48-G49-G50). I noen tilfeller er noen av residene som var nær opptil TPP forskjellige mellom POX og AHAS, men forblir i en region som er sterkt konservert (for eksempel residene 90-110). Derimot ser det ut til at FAD bindingssetet er mindre konservert. Til tross for at noen FAD bindende residier ble sterkt konservert (for eksempel D325-I326-D327-P328), var andre klart forskjellige mellom AHAS og POX (for eksempel, residene i løkken fra posisjonen 278 til 285 er ikke homologe). En detaljert analyse viste at, i det minste for noen av de mindre konserverte kontaktsetene, at interaksjoner var formidlet av polypeptidskjelettet i stedet for av sidekjedene. Konserveringen var bare nødvendig for polypeptidfoldingen og var ikke nødvendig for aminosyresekvensen (for eksempel skjelettet til residene 258-263 binder ribitolkjeden til FAD). En halvpart av adenin og isoaloksazin bindings seter er klart forskjellige.

Etter opptelling av primærstrukturen ble en homologimodell dannet ved transposisjonen av AHAS aminosyresekvensene til POX templatstrukturen. Manglende koordinater ble trinnsvis dannet ved anvendelse av templer av aminosyreresidier til fullstendige udefinerte sidekjer. Databanksøk og energiminimalisering av små deler av molekylet ble anvendt for å fullføre konformasjonene til de udefinerte løkkeregionene. Kofaktorene TPP og FAD ble utformet til deres bindingslommer. Denne modellen ble deretter utsatt for en fullstendig, 5000 syklusenergiminimalisering. All datautforming ble utført i en IRIS Indigo Elan, R4000 arbeidsstasjon fra Silicon Graphics Co. Interaktive og molekylær utforming og energi-minimalisering ble utført ved anvendelse av Quanta/-CHARMm 4,0 fra Molecular Simulations Inc. I løpet av dette trinnet var konformasjonen stabil og indikerer at ingen sterkt uønskede interaksjoner, så som for eksempel nære van der Waals kontakter hadde oppstått. Resultatene er vist skjematisk i figur 3.

### 30 Karaktertrekkene til antatt AHAS struktur

Inspeksjon av utformet AHAS struktur beskrevet ovenfor viste at det meste av proteinet blir foldet med et skjelett som er energetisk godtagbart, med flest hydrofile sidekjer mottagelige for oppløsningsmiddelet. Overflaten til  $\beta$ -arkene er glatte og akkomoderer overkrysningsregionene som er koblet til disse.

35

En modell for dimer AHAS ble dannet ved duplikering av koordinatene til energiminimalisert monomer AHAS og overlegging av de to kopiene på to POX subenheter ved

- anvendelse av par av C $\alpha$  koordinater som definert i oppstillingsskjemaet. Polypeptidkjeden til AHAS blir foldet i tre likeledes foldede domener bestående av en 6-trådet parallelt  $\beta$ -ark kjerne omgitt av lange "løkker" og  $\alpha$ -helikser. To subenheter er oppstilt slik at den første domenen til en subenhet er i nærhet med kofaktorbindende domene 2 og 3 til den andre subenheten. Et oppløsningsmiddelfyllt område forblir mellom subenhetene i dette setet. Denne lommen, som er definert av konfluensen til de tre domenenene, er det antatte innføringssetet for substratet. Det antas også å være bindingssetet for herbicider.
- 10 Den indre overflaten til bindingslommen er beskrevet av kofaktorene. Tiazol til TPP er beliggende i bunnen av lommen. Domene 3 bidrar til den indre overflaten av lommen med en kort  $\alpha$ -heliks hvor aksene peker mot pyrofosfat til TPP, med kompensasjon av fosfatladninger med dets dipolare moment. Denne kritiske heliksen, som begynner med G498, et "vende" residie i nær kontakt med TPP, og som slutter ved F507, inneholder
- 15 tre kjente mutasjonssteder for sulfonylurea resistens: V500, W503 og F507 (se US-PS 5.013.659; 5.141.870 og 5.378.824). I domene 1 vender løkken definert som P48-S52 (mellom  $\beta$ -tråd 2 og  $\alpha$ -heliks 2) mot W503, en mutasjon som utviser resistens mot imidazolinoner. Residiene Y47 til G50 er også i kontakt med TPP. Denne løkken er ved siden av P184-Q189, en annen sving, som kobler den siste tråden av  $\beta$ -ark av domene 1
- 20 med en  $\beta$ -tråd som blir koblet med domene 2. Innenfor lommen, nære ved inngangen, er en lang region av domene 1 som reagerer med et komplementært stykke av domene 2. Residiene 125-129 og 133-137 av domene 1 og residiene 304-313 av domene 2 er ved overflaten av lommen. En sving bestående av T96-G100 er mellom løkke 125-129 og TPP. Et ytterligere område av domene 3 og to regioner av domene 2 som kler bindings-
- 25 lommen er i motsatt hjørne av lommen. Residiene 572, 575, 582 og 583 av domene 3 definerer lommeoverflaten på den ene siden. Den gjenværende delen av det indre av lommens overflate er definert av FAD og av en løkke, L278-G282, som kontakter isoalloksazin ringen til FAD.
- 30 De strukturelle modellene til AHAS proteinet kan også bli anvendt for rasjonell konstruksjon av herbicider eller AHAS inhibitorer.

## 2. Utforming av herbicider til bindingssteder

- Imazethapyr, det aktive imidazolinonet i PURSUIT®, ble plassert inn i dets antatte
- 35 bindingssete ved anvendelse av interaktiv molekylær grafikk (figur 4) og data beskrevet ovenfor (figur 4). K185 ble valgt som et "anker" for å reagere med ladninger til karboksylgruppen. Imidazolinonets NH-CO enhet ble plassert for å danne hydrogenbindinger

til G50 og A51. Dette posisjonerte metylsubstituttet av imazethapyr er opp til V500 på skjelettet til  $\alpha$ -heliks. Isopropylgruppen blir muligens bundet av hydrofobe residier til aminosyrene i regionen av residiene 125 - 135 som bidrar til den indre overflaten av lommen. Pyridinringen blir mest sannsynlig "sandwich" mellom A134 eller F135, F507 og W503. W503 reagerer også med imidazolinon ringsystemet.

På en lignende måte ble sulfonylureaherbicider utformet i et sete som delvis overlapper det beskrevne imidazolinonbindingssetet. Overlappingen av sulfonylurea og imidazolinonbindingssetene var i samsvar med konkurreringsbindingseksperimenter og med etablerte mutante data, som viser at den samme mutasjonen i mais, WO503L, kan utvise resistens overfor begge herbicidene. I disse modellene er de fleste kjente mutasjonssetene som utviser sulfonylureaherbicidresistens, dvs. G50, A51, K185, V500, W503, F507 i nær kontakt med bundede herbicider. P126 og A51 er nødvendig for å holde K185 sidekjeden på plass ved å danne en hydrofob pore. S582, et sete for spesifikk imidazolinonresistens, er lang fra bindings-regionen og er beliggende i regionen hvor homologien er så dårlig at en forandring i folden er ventet. FAD bindingssetet har sannsynligvis lav homologi mellom AHAS og POX i denne regionen; S582 er et residie som utviser resistens i mais, og denne S582 og dets ved siden av liggende residier er i næ kontakt med aktiv setelommen. Det antas at FAD og løkkeregionen omfattende residiene 278 til 285 er beliggende litt bort fra den tredje domenen, (nedover i figur 4) og at en løkke som inneholder S582 blir foldet i rommet mellom heliksen i posisjonene 499 til 507 og løkken i posisjonene 278 til 285. D305, et annet kjent resistenssete er i nærheten av FAD og modulerer interaksjonen mellom domenene 1 og 2. M280 er enten involvert i posisjonering av heliksen i posisjonene 498 til 507 eller direkte i inhibitorbinding. M280 og D305 kan også være direkte involvert i den inhiberende bindingen dersom domenene 1 og 2 blir flyttet noe nærmere hverandre.

### 3. Seleksjon av mutasjoner

Spesifikke aminosyreresidier er nøyaktig bestemt som seter for innføring av mutasjoner i den primære sekvensen til AHAS. Disse aminosyrene blir selektert på deres posisjon ved at dersom denne aminosyreresidieposisjonen er modifisert vil det være en resulterende endring (dvs. reduksjon) i affiniteten som et herbicid har for bindingslommen. Det er ikke nødvendig at mutasjonsposisjonen ligger i bindingslommen, idet aminosyreresidiene utenfor selve lommen kan endre lommeladningen eller konfigurasjonen.

Seleksjon av målseter for mutasjon blir oppnådd ved anvendelse av molekylære modeller som beskrevet ovenfor. For eksempel ifølge modellen ovenfor, er arginin i posisjon 128 betegnet R128 i figur 1 ved anvendelse av enkelt-bokstavkoden for amino-

syrene (beliggende nære inngangen til substrat- og herbicid-bindingslommen og har en større grad av konformasjonsfrihet som kan muliggjøre at den deltar i transporten av ladede herbicider inn i bindingslommen. Dette residiet er derfor erstattet av alanin for å fjerne både dets ladning og dets lange hydrofobe sidekjede. (Resulterende mutasjon er 5 betegnet R128A).

Mutasjonene kan omfatte enkeltmutasjoner som erstatter vill-type sekvensen med en hvilke som helst annen aminosyre. Alternativt kan mutasjonene omfatte delesjoner eller addisjoner av en eller flere aminosyrer, fortrinnsvis opptil 5, ved et gitt sete. Den tilsatte 10 sekvensen kan omfatte en aminosyresekvens kjent for å eksistere i et annet protein, eller kan omfatte en fullstendig syntetisk sekvens. Videre kan mer enn en mutasjon og/eller mer enn en mutasjonstype bli introdusert i et enkelt polypeptid.

#### 4. Sete-rettet mutagenese

15 DNA kodende for AHAS kan bli manipulert for å innføre ønskede mutasjoner.

Mutagenesene blir utført ved anvendelse av metoder som er standard ifølge fagområdet, som beskrevet i for eksempel Higuchi, R., Recombinant PCR, In M.A. Innis, et al., eds, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, s. 177-183, 1990.

20

#### 5. Ekspresjon og rensing av varianter

Mutante eller variant AHAS sekvensen blir klonet inn i en DNA ekspresjonsvektor (se for eksempel eksempel 3) og blir uttrykt i en egnet celle så som for eksempel, E. coli. Det er foretrukket at DNA kodende for AHAS er koblet til et transkripsjonsregulatorisk 25 element, og varianten AHAS blir uttrykt som del av et fusjonsprotein, for eksempel, glutation-S-transferase, for å lette rensingen (se eksempel 3 nedenfor). Variant AHAS blir deretter rensset ved anvendelse av affinitetskromatografi eller en annen egnet metode kjent innenfor fagområdet. "Rensing" av et AHAS polypeptid refererer til isolering av AHAS polypeptidet i en form som muliggjør at dets enzymatiske aktivitet blir målt uten 30 innvirkning av andre komponenter i cellen hvori polypeptidet blir uttrykt.

#### 6. Analysering av enzymatiske egenskaper

Rensset variant AHAS kan bli analyser for en eller flere av følgende tre egenskaper:

35 (a) spesifikk eller katalytisk aktivitet for omdanning av pyruvat til acetolaktat (uttrykt som enheter/mg ren AHAS, hvori en aktivitetseenhet er definert som 1  $\mu$ mol acetolaktat produsert/time), eller for kondensasjon av pyruvat og 2-ketobutyrat for

å danne acetohydroksybutyrat (uttrykt som enheter/mg ren AHAS, hvori en aktivitets-enhet er definert som 1  $\mu$ mol acetohydroksybutyrat produsert/t.;

(b) inhibisjonsnivåer av herbicidet, så som for eksempel imidazolinon  
5 (uttrykt som IC<sub>50</sub>, konsentrasjon hvorved 50% av aktiviteten til enzymet er inhibert);  
og

(c) selektiviteten til motstanden overfor selektert herbicid vs. andre herbi-  
cider. Selektivitetsindeksen er definert som ganger resistens som mutanten har overfor  
10 imidazolinoner i forhold til vill-typeenzym, delt på ganger resistens som samme mutant  
har overfor andre herbicider også i forhold til vill-typen). Ganger resistens overfor et  
herbicid i forhold til vill-type enzymet blir uttrykt som IC<sub>50</sub> til varianten, del på IC<sub>50</sub>  
til villtypen. Selektivitetsindeksen (S.I.) kan derfor bli representert i følgende ligning:

$$15 \quad \text{S.I.} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ til varianten for herb. A} / \text{IC}_{50} \text{ villtype for herb. A}}{\text{IC}_{50} \text{ til varianten for herb. B} / \text{IC}_{50} \text{ villtype for herb. B}}$$

Egnede analysesystemer for å danne disse bestemmelsene innbefatter, men er ikke  
20 begrenset til, de som er beskrevet i detalj i eksempel 4 nedenfor.

#### 7.a. Vurdering av egnede varianter

De enzymatiske egenskapene til variant AHAS polypeptidene blir sammenlignet med  
villtype AHAS. Det er foretrukket at en gitt mutasjon resulterer i et AHAS variant  
25 polypeptid som beholder dets in vitro enzymatiske aktivitet overfor puruvat og pyruvat  
og 2-ketobutytrat, dvs. omdanningen av pyruvat til acetolaktat eller ved kondensasjon av  
pyruvat og 2-ketobutytrat for å danne acetohydroksybutyrat (og som følgelig er ventet å  
være biologisk aktive in vivo), mens en utviser katalytisk aktivitet som er relativt mer  
resistent overfor selekterte herbicider enn vill-type AHAS. Det er foretrukket at variant  
30 AHAS utviser:

- (i) i fravær av minst et herbicid,
  - (a) katalytisk aktivitet alene tilstrekkelig for å opprettholde levedyktigheten til en celle  
som den blir uttrykt i; eller
  - (b) katalytisk aktivitet i kombinasjon med et hvilket som helst herbicid resistent AHAS  
35 variantprotein som også blir uttrykt i cellen, som kan være den samme som eller  
forskjellig fra første AHAS variantprotein, tilstrekkelig for å opprettholde  
levedyktigheten til en celle som det blir uttrykt i; hvori cellen krever AHAS aktivitet  
for levedyktighet; og

(ii) katalytisk aktivitet som er mer resistent overfor minst et herbicid enn villtype AHAS;

og som er relativt mer resistent overfor herbicidet enn villtype AHAS.

- 5 Et hvilket som helst spesifikt AHAS variantprotein trenger ikke å ha den totale katalytiske aktiviteten nødvendig for å opprettholde levedyktigheten til cellen, men må ha en viss katalytisk aktivitet i en mengde, alene eller i kombinasjon med den katalytiske aktiviteten av ytterligere kopier av samme AHAS variant og/eller den katalytiske aktiviteten til andre AHAS variant proteiner, tilstrekkelig for å opprettholde levedyktig-
- 10 heten til en celle som krever AHAS aktivitet for levedyktighet. For eksempel kan den katalytiske aktiviteten bli øket til minimale akseptable nivåer ved å innføre flere kopier av en variant kodende for genet inn i cellen eller ved å innføre genet som videre innbefatter en relativt sterk promoter for å forsterke produksjonen av varianten.
- 15 Mer resistent betyr at den katalytiske aktiviteten til varianten blir redusert av herbicidet, om i det hele tatt, i en mindre grad enn vill-type AHAS katalytisk aktivitet blir redusert av herbicidet. Foretrukket mer resistent variant AHAS forblir tilstrekkelig katalytisk for å opprettholde levedyktigheten til en celle, plante eller organisme hvori ved samme konsentrasjon av samme herbicid ville vill-type AHAS ikke opprettholde tilstrekkelig katalytisk aktivitet for å opprettholde levedyktigheten til cellen, planten eller organismen.
- 20

Det er foretrukket at den katalytiske aktiviteten i fravær av herbicider er på minst omtrent 5%, og mest foretrukket, mer enn omtrent 2% av den katalytiske aktiviteten til villtype AHAS i fravær av herbicider. De mest foretrukne AHAS variantene er mer resistente overfor imidazolinherbicider enn andre herbicider så som sulfonyleurea-baserte herbicider, men i noen søknader er selektivitet hverken nødvendig eller foretrukket.

25

Når det gjelder imidazolinonresistent variant AHAS er det foretrukket at AHAS variantproteinet har

- 30 (i) katalytisk aktivitet i fravær av nevnte herbicid på mer enn omtrent 20% av den katalytiske aktiviteten til nevnte villtype AHAS;
- (ii) katalytisk aktivitet som er relativt mer resistent overfor tilstedeværelse av imidazolinonherbicider sammenlignet med villtype AHAS; og
- (iii) katalytisk aktivitet som er relativt mer sensitiv overfor tilstedeværelse av sulfonyleureaherbicider sammenlignet med imidazolinonherbicider. De mest foretrukne herbicid-resistente AHAS varianter utviser en minimal spesifikk aktivitet på omtrent 20
- 35

enheter/mg, minimal eller ingen inhibisjon av imidazolinon, og en selektivitetsindeks som varierer fra omtrent 1,3 til omtrent 3000 i forhold til andre herbicider.

Uten å være bundet til noen teori antas det at systematisk og interativ applikasjon av denne metoden til villtype eller annet mål AHAS protein vil resultere i produksjon av AHAS varianter som har de ønskede egenskapene som omfatter høy enzymatisk aktivitet som forklart ovenfor og resistens overfor en eller flere klasser av herbicider. For eksempel kan mutasjon av en villtype AHAS sekvens ved en bestemt posisjon til en gitt aminosyre resultere i en mutant som utviser en høy grad av herbicid resistens, men et betydelig tap av enzymatisk aktivitet overfor pyruvat eller puruvat og 2-ketobutyrat. I en annen søknad av ovennevnte metode, vil begynnende eller mål AHAS polypeptidet deretter være denne varianten (i stedet for vill-type AHAS). Rasjonell konstruksjon innbefatter følgelig substituering av andre aminosyrer ved den opprinnelige muterte posisjonen og/eller tilsetning eller deletering av aminosyrer ved selekterte posisjoner eller områder ved å anta opprettholdelse av herbicidresistens, men også opprettholdelse av et høyere nivå av enzymatisk aktivitet.

Den strukturbaserte rasjonelle konstruksjonen av herbicidresistente AHAS proteiner gir mange fordeler i forhold til konvensjonelle metoder som bygger på tilfeldig mutagenese og seleksjon. Når substitusjon av en bestemt aminosyre med en annen krevet substitusjon av mer enn et nukleotid i kodonet, er sannsynligheten for at dette oppstår tilfeldig så lav at det ikke er praktisk. I kontrast til dette, selv dobbelt eller trippel forandringer i nukleotidsekvensen innenfor et kodon kan lett bli implementert, når foreslått ved en rasjonell konstruksjonsmetode. En rasjonell konstruksjonsmutasjon for å utvise selektiv imidazolinonresistens krever en forandring fra arginin til glutamat. Arginin blir kodet av CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG, mens glutamat blir kodet av GAA og GAG. På grunn av at ingen av argininkodonene begynner med GA, vil denne mutasjonen kreve en dobbelsubstitusjon av ved siden av liggende nukleotider som vil oppstå så sjeldent ved anvendelse av tilfeldig mutagenese at det er usannsynlig at det vil resultere i vellykket resultat. Til tross for at mutasjonsfrekvensen kan bli øket i løpet av den tilfeldige mutagenesen, vil endringer i nukleotidsekvensen ha en like stor sannsynlighet for å oppstå i AHAS genet, i fravær av tidligere sete-retting av mutasjonene. Dette øker sjansen for å oppnå en irrelevant mutasjon som interfererer med den enzymatiske aktiviteten. Det er sjeldent, ved anvendelse av tilfeldig mutagenese, å finne en multippel aminosyresubstitusjon, delesjon eller substitusjon/delesjonsmutasjon som utviser herbicidresistens, mens den katalytiske aktiviteten opprettholdes. Delesjonsmutasjoner som utviser herbicidresistens er også usannsynlig ved anvendelse

av en tilfeldig mutagenesemetode. Delesjoner må være begrenset til små regioner og ville måtte oppstå i tripler for å beholde AHAS avlesningsrammen for å opprettholde enzymatisk aktivitet.

- 5 Med en rasjonell struktur-basert metode, blir dobbelt aminosyresubstitusjon og/eller delesjonsmutasjoner relativt lett oppnådd og nøyaktig målsøkt. Forskjellige mutagener anvendt i tilfeldig mutagenese danner spesifikke typer av mutasjoner. For eksempel danner natriumazid punktsubstitusjonsmutasjoner i planter, mens bestråling pleier å danne delesjoner. To mutageneseprotokoller må følgelig bli anvendt for å oppnå en
- 10 multipel kombinasjon substitusjon/delesjon.

Foreliggende struktur-baserte metode for rasjonell konstruksjon av herbicid-resistente AHAS varianter muliggjør forbedring av herbicidresistens mutasjoner, et trinn som ikke blir oppnådd ved tilfeldig mutagenese. Identifikasjon av et substitusjonssete for herbi-

15 cidresistens ved tilfeldig mutagenese kan tilveiebringe liten, om noen, forutsigbar verdi for rettleiding av ytterligere forbedringer i karaktertrekkene til mutanten. Den foreliggende strukturbaserte metoden muliggjør derimot for forbedringer basert på posisjonen, omgivelsene og funksjonen til aminosyreposisjonen i den strukturelle modellen.

- 20 Den forbedrede metoden muliggjør også uavhengig manipulasjon av tre viktige egenskaper til AHAS: motstandsnivået, selektiviteten til motstanden og den katalytiske effektiviteten. For eksempel kan kompensatoriske mutasjoner bli konstruert på en forutsigbar måte. Dersom en bestemt mutasjon har en skadelig effekt på aktiviteten til et enzym kan en andre kompensatorisk mutasjon bli anvendt for å gjenopprette aktiviteten.
- 25 For eksempel kan en forandring i nettoladning innenfor en domene når et ladet residie blir innført eller tapt på grunn av en mutasjon bli kompensert ved innføring av en andre mutasjon. Det å forutsi posisjonen og type av residier som skal bli innført, deletert eller substituert ved det andre setet for å gjenopprette den enzymatiske aktiviteten krever en kunnskap når det gjelder struktur-funksjonsforholdet oppnådd fra en modell som den
- 30 som blir beskrevet her.

#### 7.b. Konstruksjon av ikke-peptidherbicer eller AHAS inhibitorer

- En kjemisk del som endrer og som kan passe inn det aktive setet til målproteinet eller bli bundet i en hvilke som helst posisjon hvor den kan inhibere aktiviteten kan bli
- 35 konstruert ifølge fremgangsmåter kjent innenfor fagområdet, så som for eksempel, datakonstruksjonsprogrammer som assisterer i konstruksjon av forbindelser som spesifikt reagerer med et reseptorsete.

Et eksempel på et slikt program er LUDI (Biosym Technologies - San Diego, CA) (se også Lam et al., Science 263:380, 1994; Thompson, et al., J. Med. Chem., 37:3100, 1994).

5

Bindingslommen og spesielt aminosyreresidene som er blitt identifisert å være involvert som inhibitorbinding kan bli anvendt som forankringspunkter for inhibitor-konstruksjon.

- 10 Konstruksjon av sete-spesifikke herbicider er fordelaktige for kontrollering av ugressarter som spontant kan utvikle herbicid resistens i felten, spesielt på grunn av mutasjoner i AHAS genet.

#### Herbicidresistente AHAS varianter: DNA, vektorer og polypeptider

- 15 Foreliggende oppfinnelse omfatter også isolerte DNA molekyler kodende for variant herbicidresistente AHAS polypeptider. Gener kodende for AHAS polypeptider ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli avledet fra en hvilken som helst art og fortrinnsvis en planteart, og mutasjoner som utviser herbicid resistens kan bli innført ved ekvivalente posisjoner innenfor hvilken som helst av disse AHAS genene. Ekvivalensen til en gitt
- 20 kodon posisjon i forskjellige AHAS gener er en funksjon av både konservering av primære aminosyresekvens og dets protein og retensjon av lignende tre-dimensjonale struktur. Figur 5 illustrerer for eksempel den høye graden av sekvenshomologi mellom AHAS polypeptider avledet fra forskjellige plantearter. Disse AHAS polypeptidene utviser minst omtrent 60 til omtrent 70% total homologi. Uten å være bundet til noen
- 25 teori antas det at det i regioner av polypeptidet som har en sterkt konservert sekvens vil polypeptidkjedekonformasjonen også bli konservert. Det er følgelig mulig å anvende en AHAS-kodende sekvens fra en art for molekylær modellering, for å introdusere mutasjoner forutsigbart inn i AHAS genet fra en annen art for opprinnelig testing og forbedring, og til slutt, for å innføre optimaliserte mutasjoner i AHAS avledet fra en
- 30 tredje planteart for ekspresjon i en transgen plante.

- I en serie av utførelsesformer koder disse AHAS for DNA varianter av et AHAS polypeptid og fortrinnsvis fra mais AHAS polypeptid ifølge figur 1 hvor polypeptidet er modifisert ved substitusjon ved eller delesjon før eller etter en eller flere av figur 1
- 35 aminosyreresidene

P48, G49, S52, M53,  
 E54, A84, A95, T96, S97, G98, P99, G100, A101, V125, R127,  
 R128, M129, I130, G131, T132, D133, F135, Q136, D186, I187,  
 T259, T260, L261, M262, G263, R276, M277, L278, G279, H281,  
 G282, T283, V284, G300, V301, R302, F303, D304, R306, V307,  
 T308, G309, K310, I311, E312, A313, F314, A315, S316, R317,  
 A318, K319, I320, E329, I330, K332, N333, K334, Q335, T404,  
 G413, V414, G415, Q416, H417, Q418, M419, W420, A421, A422,  
 L434, S435, S436, A437, G438, L439, G440, A441, M442, G443,  
 D467, G468, S469, L471, N473, L477, M479, Q495, H496, L497,  
 G498, M499, V501, Q502, Q504, D505, R506, Y508, K509, A510,  
 N511, R512, A513, H514, T515, S524, H572, Q573, E574, H575,  
 V576, L577, P578, M579, I580, P581, G583, G584,

funksjonelle ekvivalenter av hvilke som helst av de foregående; innskudd eller dele-  
 5 sjoner mellom figur 1 Q124 og H150 eller funksjonelle ekvivalenter derav; innskudd  
 eller delesjoner mellom figur 1 G300 og D324 eller funksjonelle ekvivalenter derav; og  
 hvilke som helst kombinasjon av hvilke som helst av de foregående.

Mutasjoner, når de blir innført i polypeptidet ifølge figur 1 eller ved tilsvarende  
 10 posisjoner i et annet plante AHAS gen, kan omfatte endringer i DNA sekvensen som  
 resulterer i en enkel substitusjon av hvilke som helst av en eller flere andre aminosyrer  
 eller delesjoner på opptil 5 aminosyreresidier før eller opptil 5 aminosyreresidier etter  
 hvilke som helst av residiene angitt ovenfor. Egnede aminosyresubstitusjoner innbe-  
 fatter, men er ikke begrenset til, naturlig forekommende aminosyrer.

15 Alternativt kan mutasjonene omfatte endringer i DNA sekvensen slik at en eller flere  
 aminosyrer blir tilsatt eller deletert i rammen ved ovennevnte posisjoner. Det er fore-  
 trukket at addisjonene omfatter omtrent 3 til omtrent 30 nukleotider, og delesjonene  
 omfatter omtrent 3 til omtrent 30 nukleotider. Et enkelt mutantpolypeptid kan videre  
 20 inneholde mer enn en lignende eller annen mutasjon.

Foreliggende oppfinnelse omfatter DNA som koder for AHAS variantproteinet.  
 Nukleinsyresekvenser kodende for AHAS polypeptider kan bli flankert av naturlige  
 AHAS regulatoriske sekvenser, eller kan bli assosiert med heterologe sekvenser,  
 25 inkludert promotere, enhancere, responselementer, signalsekvenser, polyadenylerings-  
 sekvenser, introner, 5'- og 3'-ikke-kodende regioner og lignende. Nukleinsyre kan bli  
 modifisert for å endre stabilitet, oppløselighet, bindingsaffinitet og spesifisitet. For

eksempel kan variant AHAS-kodende sekvenser bli selektivt metylert. Nukleinsyre-sekvensene ifølge foreliggende oppfinnelse kan også bli modifisert med en markør som har evne til å tilveiebringe et detekterbart signal, enten direkte eller indirekte. Eksempler på markører innbefatter radioisotoper, fluorescensmolekyler, biotin og lignende.

5

Oppfinnelsen tilveiebringer også vektorer omfattende nukleinsyrer kodende for AHAS varianter. Et stort antall vektorer, inkludert plasmid og soppvektorer, er blitt beskrevet for ekspresjon i forskjellige eukaryote og prokaryote verter. Det er fordelaktig at vektorene også innbefatter en promoter operabelt koblet til AHAS kodende del. Kodet  
 10 AHAS kan bli uttrykt ved anvendelse av egnede vektorer og vertsceller, ved anvendelse av fremgangsmåtene beskrevet eller sitert heri eller er ellers kjent for fagfolk innenfor det relevante fagområdet. Eksempler på egnede vektorer innbefatter uten begrensning pBIN-baserte vektorer, pBLuescript vektorer og pGEM vektorer.

15 Foreliggende oppfinnelse omfatter også både variant herbicid-resistente AHAS polypeptider eller peptidfragmenter derav. Som forklart ovenfor kan variant AHAS polypeptidene bli avledet fra mais polypeptidet vist i figur 1 eller fra en hvilken som helst plante eller mikrobielt AHAS polypeptid, fortrinnsvis plante AHAS polypeptid. Polypeptidene kan bli ytterligere modifisert ved for eksempel fosforylering, sulfoner-  
 20 ing, acylering, glykosylering eller andre proteinmodifikasjoner. Polypeptidene kan bli isolert fra planter eller fra heterologe organismer eller celler (inkludert, men ikke begrenset til, bakterier, gjær, insekt, plante og pattedyrceller) hvori genet kodende for et variant AHAS polypeptid er blitt introdusert og uttrykt. AHAS polypeptidene kan videre bli modifisert med en markør som har evne til å tilveiebringe et deketerbart  
 25 signal, enten direkte eller indirekte, inkludert radioisotoper, fluorescensforbindelser og lignende.

#### Kjemiske-resistente planter og planter inneholdende variant AHAS gener

Foreliggende oppfinnelse omfatter transgene celler og frø, hvori gener kodende for  
 30 herbicid-resistente AHAS varianter er blitt innført. Ikke-begrensede eksempler på egnede mottaker planter er oppført i tabell 1 nedenfor:

TABELL 1  
Mottakerplanter

Vanlig navn	Familie	Latinsk navn
Mais	Graminieae	<i>Zea mays</i>
Mais, dent	Gramineae	<i>Zea mays dentiformis</i>
Mais, flint	Graminieae	<i>Zea mays vulgaris</i>
Mais, Pop	Graminieae	<i>Zea mays microsperma</i>
Mais, soft	Gramineae	<i>Zea mays amylacea</i>
Mais, sweet	Gramineae	<i>Zea mays saccharate</i>
Mais, waxy	Graminieae	<i>Zea mays ceratina</i>
Hvete, dinkel	Pooideae	<i>Triticum spelta</i>
Hvete, durum	Pooideae	<i>Triticum durum</i>
Hvete, English	Pooideae	<i>Triticum turgidum</i>
Hvete, Large Spelt	Pooideae	<i>Triticum spelta</i>
Hvete, Polish	Pooideae	<i>Triticum polonium</i>
Hvete, Poulard	Pooideae	<i>Triticum turgidum</i>
Hvete, Singlegrained	Pooideae	<i>Triticum monococcum</i>
Hvete, Small Spelt	Pooideae	<i>Triticum monococcum</i>
Hvete, Soft	Pooideae	<i>Triticum aestivum</i>
Ris	Gramineae	<i>Oryza sativa</i>
Ris, American Wild	Gramineae	<i>Zizania aquatica</i>
Ris, Australian	Gramineae	<i>Oryza australiensis</i>
Ris, Indian	Gramineae	<i>Zizania aquatica</i>
Ris, rød	Gramineae	<i>Oryza glaberrima</i>
Ris, Tuscarora	Gramineae	<i>Zizania aquatica</i>
Ris, West African	Gramineae	<i>Oryza glaberrima</i>
Bygg	Pooideae	<i>Hordeum vulgare</i>
Bygg, Abyssinian Intermediate, også Irregular	Pooideae	<i>Hordeum irregulare</i>
Bygg, Ancestral Tworow	Pooideae	<i>Hordeum spontaneum</i>
Bygg, Beardless	Pooideae	<i>Hordeum trifurcatum</i>
Bygg, Egyptian	Pooideae	<i>Hordeum trifurcatum</i>
Bygg, fourrowed	Pooideae	<i>Hordeum vulgare polystichen</i>

TABELL 1 (forts.)  
Mottakerplanter

5

	Familie	Latinsk navn
Barley, sixrowed	Pooideae	Hordeum vulgare hexastichon
Barley, Tworowed	Pooideae	Hordeum distichon
Bomull, Abroma	Dicotyledoneae	Abroma augusta
Bomull, American Upland	Malvaceae	Gossypium hirsutum
Bomull, Asiatic Tree, også Indian Tree	Malvaceae	Gossypium barbadense
Bomull, Brazilian også, Kidney, og Pernaumbuco	Malvaceae	Gossypium barbadense brasiliense
Bomull, Levant	Malvaceae	Gossypium herbceum
Bomull, Long Silk, også Long Staple, Sea Island	Malvaceae	Gossypium hirsutum
Bomull, Mexican, også Short Staple	Malvaceae	Gossypium hirsutum
Soyabønne, Soya	Leguminosae	Glycine max
Sukkerroe	Chenopodiaceae	Beta vulgaris altissima
Sukkerrør	Woody-plant	Arenga pinnata
Tomat	Solanaceae	Lycopersicon esculentum
Tomat, Cherry	Solanaceae	Lycopersicon esculentum cerasiforme
Tomat, Common	Solanaceae	Lycopersicon esculentum commune
Tomt, Currant	Solanaceae	Lycopersicon pimpinellifolium

Tomat, husk	Solanaceae	Physalis ixocarpa
Tomta, Hyenas	Solanaceae	Lycopersicon
<u>TABELL 1 (forts.)</u> <u>Mottakerplanter</u>		
Tomat, Pear	Solanaceae	Lycopersicon esculentum pyriforme
Tomat, Tree	Solanaceae	Cyphomandra betacea
Potet	Solanaceae	Solanum tuberosum
Potet, Spanish, Sweet potato	Convolvulaceae	Ipomoea batatas
Rug, Common	Pooideae	Secale cereale
Rug, Mountain	Pooideae	Secale montanum
Pepper, Bell	Solanaceae	Capsicum annuum grossum
Pepper, Bird, også Cayenne, Guinea	Solanaceae	Capsicum annuum minimum
Pepper, Bonnet	Solanaceae	Capsicum sinense
Pepper, Bullnose, også Sweet	Solanaceae	Capsicum annuum grossum
Pepper, Cherry	Solanaceae	Capsicum annuum cerasiforme
Pepper, Cluster, også Red Cluster	Solanaceae	Capsicum annuum fasciculatum
Pepper, Goat, også Spur	Solanaceae	Capsicum frutescens
Pepper, Long	Solanaceae	Capsicum frutescens longum

TABELL 1  
Mottakerplanter

Vanlig navn	Familie	Latinsk navn
Pepper, Ornamental Red, også Wrinkled	Solanaceae	Capsicum annuum abbreviatum
Pepper, Tobasco Red	Solanaceae	Capsicum annuum conoides
Salat, Garden	Compositae	Lactuca sativa
Salat, Asparagus, også Celery	Compositae	Lactuca sativa asparagina
Salat, Blue	Compositae	Lactuca perennis
Salat, Blue, også Chicory	Compositae	Lactuca pulchella
Salat, Cabbage, også Head	Compositae	Lactuca sativa capitata
Salat, Cos, også Longleaf, Romaine	Compositae	Lactuca sativa longifolia
Salat, Crinkle, også Curled, Cutting, Leaf	Compositae	Lactuca sativa crispa
Selleri	Umbelliferae	Apium graveolens dulce
Selleri, Blanching, også Garden	Umbelliferae	Apium graveolens dulce
Selleri, Root, også Turniprooted	Umbelliferae	Apium graveolens rapacetum
Eggeplante, Garden	Solonaceae	Solanum melongena

TABELL 1  
Mottakerplanter

Vanlig navn	Familie	Latinsk navn
Sorghum	Sorghum	All crop species
Alfalfa	Leguminosae	Medicago sativum
Gulrot	Umbelliferae	Daucus carota sativa
Bønner, Climbing	Leguminosae	Phaseolus vulgaris vulgaris
Bønner, Sprouts	Leguminosae	Phaseolus aureus
Bønner, Brazilian Broad	Leguminosae	Canavalia ensiformis
Bønner, Broad	Leguminosae	Vicia faba
Bønner, Common, også French White, Kidney	Leguminosae	Phaseolus vulgaris
Bønner, Egyptian	Leguminosae	Dolichos lablab
Bønner, long, også Yardlong	Leguminosae	Vigna sesquipedalis
Bønner, Winged	Leguminosae	Psophocarpus tetragonolobus
Havre, også Commin, Side, Tree	Avena	Sativa
Havre, black ogsp Bristle, Lopsided	Avena	Strigosa
Havre, Bristle	Avena	
Erter, også Garden, Green, Shelling	Leguminosae	Pisum, sativum sativum
Erter, Plackeyed	Leguminosae	Vigna sinensis
Erter, Edible Podded	Leguminosae	Pisum sativum axiphium
Erter, Grey	Leguminosae	Pisum sativum speciosum
Erter, Winged	Leguminosae	Tetragonolobus purpureus

TABELL 1  
Mottakerplanter

Vanlig navn	Familie	Latinsk navn
Erter, Wrinkled	Leguminosae	Pisum sativum medullare
Solsikke	Compositae	Helianthus annuus
Squash, Autumn, Winter	Dicotylodoneae	Cucurbita maxima
Squash, Bush, også Summer	Dicotyledoneae	Cucurbita pepo melopepo
Squash, Turban	Dicotyledoneae	Cucurbita maxima turbaniformis
Agurk	Dicotyledoneae	Cucumis sativus
Agurk, African også Bitter		Momordica charantia
Agurk, Squirting, også Wild		Ecballium elaterium
Agurk, Wild		Cucumis anguria
Poplar, California	Woody-Plant	Populus trichocarpa
Poplar, European Black		Populus nigra
Poplar, Gray		Populus canescens
Poplar, Lombardy		Populus italica
Poplar, Silverleaf, også White		Populus alba
Poplar, Western Balsam		Populus trichocarpa
Tobakk	Solanaceae	Nicotiana
Arabidopsis Thaliana	Cruciferae	Arabidopsis thaliana
Gresstorv	Lolium	
Gresstorv	Agrostis	
	Other families of turfgrass	
Kløver	Leguminosae	

Ekspresjon av variant AHAS polypeptider i transgene planter utviser en høy grad av resistens overfor herbicider inkludert, men ikke begrenset til, imidazolinonherbicider så som for eksempel imazethapyr (PURSUIT®), som muliggjør anvendelse av disse herbicidene i løpet av dyrking av transgene planter.

Fremgangsmåte for innføring av fremmede gener inn i planter er kjente innenfor fagområdet. Ikke-begrensede eksempler på slike metoder innbefatter *Agrobacterium* infeksjon, partikkel bombardement, polyetylen glykol (PEG) behandling av protoplaster, elektroporasjon av protoplaster, mikroinjeksjon, makroinjeksjon, tiller injeksjon, pollenrørreaksjonsvei, tørr frø imibisjon, laserperforasjon og elektroforese. Disse fremgangsmåtene er for eksempel beskrevet i B. Jenes et al., og S.W. Ritschie et al. In *Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization*, ed. S. -D. Kung, R. Wu, Academic Press, Inc., Harcourt Brace Jovanovich 1993; og L. Mannonen et al., *Critical Reviews in Biotechnology*, 14:287-310, 1994.

I en foretrukket utførelsesform blir DNA kodende for en variant AHAS klonet inn i en DNA vektor inneholdende et antibiotikaresistensmarkørgen, og rekombinant AHAS-DNA inneholdende plasmid blir innført i *Agrobacterium tumefaciens* inneholdende et Ti plasmid. Dette "binær vektorsystemet" er beskrevet i, for eksempel, US-patent 4.490.838 og i An et al., *Plant Mol. Biol. Manual A3: 1-19* (1988). Transformert *Agrobacterium* blir deretter dyrket sammen med bladskiver fra mottagerplanten for å muliggjøre infeksjon og transformasjon av plantecellene. Transformerte planteceller blir deretter dyrket i regenereringsmedium som fremmer dannelsen av skudd, først i nærvær av hensiktsmessig antibiotika for å selektere for transformerte celler, deretter i nærvær av herbicid. I plantecellene vellykket transformert med DNA kodende for Herbicid-resistent AHAS oppstår skuddannelse selv i nærvær av nivåer av herbicid som inhiberer skuddannelse fra ikke-transformerte celler. Etter bekreftelse på tilstedeværelse av variant AHAS DNA ved anvendelse av for eksempel polymerasekjedereaksjon (PCR) analyser, blir transformerte planter testet for deres evne til å motstå herbicid spraying og for deres evne til frøformering og rotinitiering og proliferasjon i nærvær av herbicid.

#### Andre anvendelser

Fremgangsmåtene og sammensetningene ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli anvendt i struktur-basert rasjonell konstruksjon av herbicid-resistente AHAS varianter som kan bli inkorporert i planter for å utvise selektiv herbicid resistens hos plantene. Intermediære varianter av AHAS (for eksempel varianter som utviser sub-optimal

spesifikk aktivitet, men høy motstand og selektivitet, eller det motsatte (er nyttige som templatere for konstruksjon av andre-generasjons AHAS varianter som har beholdt tilstrekkelig spesifikk aktivitet og høy resistens og selektivitet.

5 Herbicidresistente AHAS gener kan bli transformert i avlingsarter i enkelt eller multiple kopier for å utvise herbicid resistens. Genetisk konstruering av arter i avling med redusert sensitivitet overfor herbicider kan:

- (1) øke spekteret og fleksibiliteten av anvendelse av spesifikke effektive og miljømessige benigne herbicider så som imidazolinonherbicider;
- 10 (2) forsterke den kommersielle verdien til disse herbicidene;
- (3) redusere frøtrykket i avlingsfelter ved effektiv anvendelse av herbicider på herbicid resistente avlingsarter og en tilsvarende økning i innhøstningsutbyttet;
- (4) øke salget av frø for herbicid-resistente planter;
- (5) øke motstanden mot avlingsskader fra overføring av herbicider anvendt i en tidligere  
15 plantning;
- (6) redusere mottageligheten mot forandringer i herbicid karaktertrekk på grunn av negative klimabetingelser; og
- (7) øke toleransen overfor ujevnt eller feilpåførte herbicider.

20 For eksempel kan transgene AHAS variantprotein inneholdende planter bli dyrket. Avlingen kan bli behandlet med en frøkontrollerende effektiv mengde av herbicid som AHAS variant transgen plante er resistent overfor og som resulterer i frøkontroll i avlingen uten negativt å påvirke den dyrkede avlingen.

25 DNA vektorer beskrevet ovenfor som koder for herbicid-resistente AHAS varianter kan videre bli anvendt slik at ekspresjonen av AHAS varianten tilveiebringer en selekterbar markør for transformasjon av cellene ved vektoren. De antatte mottakercellene kan være i kultur eller in situ, og AHAS variantgenene kan bli anvendt alene eller i kombinasjon med andre selekterbare markører. Det eneste kravet er at mottakercellen er sensitiv  
30 overfor cytotoxiske effekter til kognatherbicidet. Denne utførelsesformen drar nytte av de relativt lave kostnadene og mangelen på toksisitet til for eksempel imidazolinon-baserte herbicider, og kan bli anvendt i et hvilket som helst system som krever DNA-mediert transformasjon.

35 Eksemplifikasjon med hensyn til foretrukne utførelsesformer

Følgende eksempler skal illustrere foreliggende oppfinnelse.

Eksempel 1: Konstruksjon av herbicidresistente AHAS varianter

Residier beliggende nær op til det antatte herbicid bindende setet til modellen beskrevet i detalj ovenfor ble selektert for mutagenese for å konstruere et aktivt AHAS polypeptid med redusert herbicidbindende kapasitet. Hvert sete på overflaten av lommen ble betraktet med hensyn på potensielle interaksjon med andre residier i lommen, samt med kofaktorer og herbicider. For eksempel er det ventet at tilføring av positivt ladede residier for å interfare med ladningsfordelingen innenfor bindingssetet resulterer i et tap av affinitet for binding av et negativt-ladet herbicid.

Tre residier ble identifisert som mest nyttige mål for mutagenese:

- 10 (1) F135 ble antatt å reagere med både isoalloksazinringen til FAD og med den aromatiske gruppen til herbicidene. I henhold til strategien for innføring av mer ladede residier inn i bindingslommen ble dette residiet endret til arginin.
- 15 (2) M53 kontakter helix 498-507. Denne helixen inneholder kjente herbicid resistens mutasjonssteder og er også implisert i TPP bindingen. Substitusjon av glutaminsyre i posisjon 53 ble antatt å favorisere en interaksjon med K185 og redusere affiniteten til K185 for karboksylatgruppen til imazethapyr.
- 20 (3) R128 er beliggende nær inngangen til lommen, hvor den er antatt å være involvert i den opprinnelige transporten av ladede herbicider inn i bindingslommen. Dette residiet ble endret til alanin for å fjerne både dets ladning og dets lange hydrofobe sidekjede.

#### Eksempel 2: Seterettet mutagenese av AHAS for å produsere herbicidresistente varianter

Arabidopsis AHAS genet ble skutt inn i ramme til 3'-enden av den kodende regionen til glutation S-transferasegenet i pGEX-2T vektoren (Pharmacia). Konstruksjon av vektoren på denne måten opprettholdt 6 aminosyretrombin gjenkjenningsekvensen ved grensen til det uttrykte glutation S-transferase (GST)/AHAS fusjonsproteinet. Trombin-spaltning av uttrykt fusjonsprotein resulterte i et AHAS protein med en N-terminal utgangsposisjon i enden av transittpeptidet ved et antatt transittpeptidprosesseringssete, med en gjenværende N-terminal glycin avledet fra trombin gjenkjenningsetet. Den endelige aminoterminalen enden til spaltet AHAS protein består av Gly-Ser-Ser-Ile-Ser. Seterettede mutasjoner ble ført inn i AHAS genet i denne vektoren.

Seterettede mutasjoner ble konstruert ifølge PCR metoden til Higuchi (Recombinant PCR. In MA Innis, et al. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego, s. 177-183, 1990). To PCR produkter, hver som overlapper mutasjonssetet, ble amplifisert. Primerene i den overlappende regionen inneholdt

mutasjon. Overlappende PCR amplifiserte fragmenter ble kombinert, denaturert og på ny smeltet sammen og produserte to mulige heterodupleksprodukter med inngående 3'-ender. De inngående 3'-endene ble utvidet av Taq DNA polymerase for å produsere et fragment som var summen av de to overlappende PCR produktene som inneholdt den 5 ønskede mutasjonen. En påfølgende reamplifikasjon av dette fragmentet med bare to "utenfor" primere resulterte i anrikning av full-lengde produktet. Produktet inneholdende mutasjonen ble deretter på ny introdusert i Arabidopsis AHAS genet i pGEX-2T vektoren.

### 10 Eksempel 3: Ekspresjon og rensing av AHAS varianter

#### A. Fremgangsmåter

E. coli (DHF $\alpha$ ) celle transformert med pGEX-2T vektoren inneholdt enten mais villtype AHAS genet (vektorbetegnelse pAC751), Arabidopsis Ser653Asn mutant, eller Arabidopsis Ile401Phe mutanten ble dyrket over natt i LB kraft inneholdende 50  $\mu\text{g/ml}$  15 ampicillin. Over natt kulturen av E. coli ble fortynnet 1:10 i 1 L LB, 50  $\mu\text{g/ml}$  ampicillin og 0,1% v/v antifoam A. Kulturen ble inkubert ved 37°C med resting helt til OD<sub>600</sub> nådde omtrent 0,8. Isopropyltiogalaktose (IPTG) ble tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 1 mM og kulturen ble inkubert i 3 ytterligere timer.

20 Cellene ble høstet ved sentrifugering ved 8,670 x g i 10 minutter i en JA-10 rotor og resuspendert i 1/100 av opprinnelig kulturvolum i MTPBS (16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7,3). Triton X-100 og lysozym ble tilsatt til endelig konsentrasjon på 1% v/v og 100  $\mu\text{g/ml}$ . Cellene ble inkubert ved 30°C i 15 minutter, avkjølt til 4°C på is og ble lysert ved sonikering i 10 sekunder på nivå 7 med en Branson 25 Sonifer Cell Disrupter utstyrt med en mikrotippprobe. Det cellefrie ekstraktet ble sentrifugert ved 35.000 x g i 10 min. ved 4°C. Supernatanten ble dekantert og sentrifugerings-trinnet ble gjentatt.

Rensing av uttrykte fusjonsproteiner ble utført som modifisert fra Smith and Johnson 30 (Gene 67:31-40), 1988). Supernatanten ble varmet til romtemperatur og ble sendt gjennom en 2 ml kolonne glutation-agarose kuler (svovelbinding, Sigma) ekvilibrert i MTPBS. Kolonnen ble deretter vasket med MTBPS ved romtemperatur helt til A<sub>280</sub> til elueringsmiddelet var i samsvar med MTPBS. Fusjonsproteinet ble deretter eluert ved anvendelse av en oppløsning inneholdende 5 mM redusert glutation i 50 mM tris HCl, 35 pH 8,0. Det eluerte fusjonsproteinet ble behandlet med omtrent 30 NIH enheter trombin og dialysert mot 50 mM sitrat pH 6,5 og 150 mM NaCl.

Fusjonsproteinet ble spaltet over natt ved romtemperatur. Spaltede prøver ble dialysert mot MTPBS og sendt to ganger gjennom en glutatation-agarosekolonne ekvilibrert i MTPBS for å fjerne frigjort glutatationtransferaseprotein. Proteinfraksjonen som ikke ble bundet til kolonnen ble samlet og ble konsentrert ved ultrafiltrering på et IM10 filter  
5 (Amicon). Den konsentrerte prøven ble applisert på en 1,5 x 95 cm Sephacryl S-100 gelfiltreringskolonne ekvilibrert i gelfiltreringsbuffer (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,0). To gelfraksjoner ble samlet ved en strømningsrate på 0,14 ml/min. Enzymstabiliteten ble testet ved lagring av enzymet ved 4°C i gelfiltreringsbuffer ved tilsetning av 0,02% natriumazid og i nærvær eller fravær av 2 mM tiaminpyrofosfat og 100 µm  
10 flavinadeninindinukleotid (FAD).

### B. Resultater

*E. coli* transformert med Pac571 plasmid inneholdende vid-type AHAS gen fusjonert nedstrøms og i ramme med GST genet uttrykte et 91 kD protein når induisert med IPTG.  
15 91 kD proteinet utviste den antatte molekylvekten til et GST/AHAS fusjonsprotein (summen på henholdsvis 26 kD og 65 kD). Når det cellefrie ekstraktet av DH5α /pAC751 ble sendt gjennom en glutatation-agarose affinitetsgel, vasket og eluert med fri glutatation ble det tilveiebrakt et preparat anrikt i 91 kD proteinet (figur 6, kolonne C). Seks aminosyretrombin gjenkjenningssettet omkonstruert i grensen av GST og AHAS  
20 ble vellykket spaltet av trombin (figur 6, kolonne D). Det spaltede fusjonsproteinpreparatet besto av ventet 26 kD GST proteinet og 65 kD mais AHAS proteinet. Mais AHAS ble rensert til homogenisitet ved en andre føring gjennom glutatation-agarosekolonnen for å affinitetssubtrahere GST og utsatt for et endelig Sephacryl S-100 gelfiltreringstrinn for å eliminere trombin (figur 6, kolonne E). 65 kD proteinet blir  
25 gjenkjent på Western blot av et monoklonalt antistoff dannet mot et mais AHAS peptid.

Renset villtype mais AHAS ble analysert ved elektropray massespektrometri og ble bestemt å ha en molekylvekt på 64,996 dalton (data ikke vist). Den antatte massen, som beregnet fra avledet aminosyresekvens til genet skutt inn i pGEX-2T vektoren, er  
30 65,058. 0,096% diskrepans mellom empirisk bestemt og antatt masse var innenfor innstillingsvariabiliteten til massespektrometeret. Nærheten til de to massebestemmelsene tydet på at det ikke var noen feilinkorporerte nukleotider i løpet av konstruksjon av ekspresjonsvektoren, og heller ingen post-translasjonelle modifikasjoner til proteinet som vil forårsake store forandringer i molekylmassen. Mangel på ukjente topper i  
35 preparatet av rensert enzym indikerte av prøven var fri for kontaminasjon.

Eksempel 4: Enzymatiske egenskaper til AHAS variantene

De enzymatiske egenskapene til vill-type og variant AHAS produsert i *E. coli* ble målt ved en modifikasjon av metoden til Singh et al. (Anal. Biochem 171:173-179, 1988) som følger:

- 5 en reaksjonsblanding inneholdende 1X AHAS analysebuffer (50 mM HEPES pH 7,0, 100 mM pyruvat, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM tiaminpyrofosfat (TPP), og 50 mM flavinadenin dinukleotid (FAD)) ble oppnådd enten ved fortykning av enzymet i 2 x analysebuffer eller ved tilsetning av konsentrert enzym til 1 x AHAS analysebuffer.
- 10 Alle analysene inneholdende imazethapyr og assosierte kontroller inneholdt en sluttkonsentrasjon på 5% DMSO på grunn av tilsetning av imazethapyr til analyseblandingen som en 50% DMSO oppløsning. Analysene ble utført i et sluttvolum på 250 µl ved 37°C i mikrotiterskåler. Etter at reaksjonen forløp i 60 minutter ble acetolaktat akkumuleringen målt kolorimetrisk som beskrevet av Singh et
- 15 al., Anal. Biochem 171:173-179, 1988.

- Mais AHAS uttrykt og renset fra pAC751 som beskrevet i eksempel 3 ovenfor er aktiv ved omdanning av pyruvat til acetolaktat. Full AHAS aktivitet er avhengig av tilstedeværelse av kofaktorene FAD og TPP i analysemediet. Ingen aktivitet ble detektert når
- 20 bare FAD ble tilsatt til analysemediet. Aktiviteten til renset enzym med bare TPP, eller uten kofaktorer, var mindre enn 1% av aktiviteten detektert i nærvær av både TPP og FAD. Normalt er AHAS som er tilstede i rå planteekstrakter meget labile, spesielt i fravær av substrat og kofaktorer. I kontrast til dette viste renset AHAS fra det bakterielle ekspressjonssystemet ikke noe tap i den katalytiske aktiviteten når lagret i 1
- 25 måned ved 4°C i 50 mM HEPES pH 7,0, 150 mM NaCl, 0,02% NaN<sub>3</sub> i nærvær eller fravær av FAD og TPP. Ingen degraderingsprodukter var synlige fra disse lagrede preparatene når oppløst i SDS-PAGE geler.

- De spesifikke aktivitetene til vill-type AHAS og M124E, R199A og F206R variantene
- 30 er vist i tabell 2 nedenfor. Bestemt utifra oppstillingen i figur 5 er M124E mutasjonen i *Arabidopsis* AHAS ekvivalenten av mais M53E mutasjonen, R199A mutasjonen i *Arabidopsis* er ekvivalent med mais R128A mutasjonen og F206R mutasjonen i *Arabidopsis* er ekvivalent med mais F135R mutasjonen. Mutasjonene vist i mais AHAS strukturelle modell ble anvendt for å identifisere ekvivalent aminosyre i dikot
- 35 *Arabidopsis* AHAS genet og ble innkorporert og testet i *Arabidopsis* AHAS genet. Denne translasjonen og innkorporeringen av rasjonelt konstruert Herbicid mutasjoner i

dikot Arabidopsis AHAS genet kan lette vurderingen av Herbicid resistensen i planter til en dikot art.

**TABELL 2**  
**SPESIFIKK AKTIVITET**

5

	Spesifikk aktivitet	% Katalytisk aktivitet sammenlignet med villtype
Vill-type	99,8	100
Met124Glu	9,15	9,16
Arg199Ala	86,3	86,5
Phe206Arg	5,07	5,1

R199A mutasjonen opprettholder et høyt nivå av katalytisk aktivitet (tabell 2), og utviser et betydelig resistensnivå overfor imazethapyr (figur 7). Denne varianten  
 10 beholder fullstendig sensitivitet overfor sulfonylureaer (figur 8). Denne varianten oppfyller kriteriene med høy spesifikk aktivitet og selektiv herbicidresistens. I kontrast til dette resulterte M124E substitusjonen i nesten fullstendig resistens overfor imazethapyr (figur 7), men utviste også betydelig redusert katalytisk aktivitet (tabell 2). I forhold til imidazolinonresistens utviste denne varianten høyere sensitivitet overfor  
 15 sulfonylurea (figur 8), og dette tyder på at dette residiet er en god kandidat for å danne en mutasjon som utviser selektiv resistens. Substitusjon av en aminosyre forskjellig fra glutaminsyre kan hjelpe til med å opprettholde den katalytiske aktiviteten. F206R substitusjonen ga lignende resultater som de som ble observert med M124E varianten, men manglet selektivitet i resistensen.

20

**Eksempel 5: Iterativ forbedring av AHAS Herbicid-resistent variant ved anvendelse av en rasjonell konstruksjonsmetode**

Forandring av residie 124 i AHAS fra Met eller Glu som beskrevet i eksempel 4 ovenfor utviste imidazolinonresistens, men reduserte også den enzymatiske aktiviteten  
 25 til 9,2% av villtype verdien. Modellen av mais AHAS strukturen beskrevet ovenfor tydet på at Met53 (tilsvarende Arabidopsis Met124 residiet) reagerte med en serie hydrofobe residier på utsiden av en  $\alpha$ -heliks som er avledet fra en separat subenhet, men som er i nærhet til Met53. Den hydrofobe interaksjonen mellom Met53 og resiadiene på heliksen kan stabilisere både subenhet/subenhet assosiasjonen og konformasjonen til det  
 30 aktive setet. Det var antatt av substitusjon av det hydrofobe Met residiet med et ladet

glutamatresidie sannsynligvis destabiliserer inter-subenhethydrofob interaksjon og resulterer i et tap av katalytisk aktivitet.

Basert på denne struktur/funksjonsanalysen, ble aktiviteten til opprinnelig Arabidopsis  
5 Met124Glu (ekvivalent med mais Met53Glu) mutantenzymet deretter iterativt forbedret ved substituering av en mer hydrofob aminosyre (Ile) ved denne posisjonen. Den hydrofobe naturen til Ile sidekjeden resulterte i gjenoppretning av aktiviteten til villtype-nivåene (spesifikk aktivitet på 102, tilsvarende 102% av vill-type aktiviteten), men høyre bulk av Ile sidekjeden kunne fortsatt opprettholde et betydelig nivå av imidazo-  
10 linonresistens (figur 9).

Substitusjon av et histidinresidie i denne posisjonen resulterte i en AHAS variant som utviser en spesifikk aktivitet på 42,5, ekvivalent med 42,6% av vill-type aktiviteten. Denne mutanten utviste til tross for dette en høy grad av resistens overfor PURSUIT®  
15 (figur 10).

Eksempel 6: Iterativ forbedring av AHAS herbicidresistent variant ved anvendelse av en rasjonal konstruksjonsmetode

Et annet eksempel på iterativ forbedring ved anvendelse av fremgangsmåten ifølge fore-  
20 liggende oppfinnelse innbefatter Arg128Ala varianten. Den strukturelle modellen til mais AHAS tydet på at Arg128 residiet, som er beliggende ved leppen til herbicid bindingslommen, bidrar til å kanalisere ladede substrater og herbicider inn i herbicid bindingslommen og inn i det aktive setet. Arg128 residiet er langt fra TPP delen, som binder det opprinnelige pyruvat molekylet i reaksjonsmekanismen til AHAS, og for-  
25 klarer hvorfor substitusjon av Arabidopsis AHAS Arg199 (ekvivalent med mais Arg128) til alanin hadde liten virkning på den katalytiske aktiviteten til enzymet. Den strukturelle modellen indikerte videre at en mer radikal forandring kunne bli dannet i denne posisjonen for å øke motstandsnivået, med opprettholdelse av høye nivåer av katalytisk aktivitet. På dette grunnlaget ble en iterativ forbedring av mutasjonen dannet  
30 for å substituere positivt ladet argininresidie med et negativt ladet glutamatresidie. Enzymet mutert på denne måten hadde forbedrede nivåer av motstand overfor PERSUIT, med opprettholdelse av høye aktivitetsnivåer (spesifikk aktivitet på 114, tilsvarende 114% av vill-type aktiviteten (figur 11).

**Eksempel 7: Omveksling av AHAS avledet fra forskjellige arter i strukturbasert rasjonell konstruksjon av herbicidresistente AHAS varianter**

En strukturell modell av den tre-dimensjonale strukturen til AHAS blir dannet med en monokot AHAS sekvens som den som er avledet fra mais, som beskrevet ovenfor. For å  
 5 innføre mutasjoner inn i AHAS avledet fra en dikot art så som Arabidopsis, blir sekvensene til AHAS avledet fra monokot og dikot artene oppstilt ved anvendelse av GAP og PILEUP programmene (Genetics Computer Group, 575 Sequence Drive, Madison, WI 53711). Ekvivalente posisjoner blir bestemt fra computer-dannet oppstilling. Mutasjonene blir deretter introdusert inn i dikot AHAS genet som beskrevet  
 10 ovenfor. Etter ekspresjon av mutant AHAS protein i E. coli og vurdering av dets biokjemiske egenskaper (dvs. spesifikk aktivitet og resistens overfor herbicider), blir det mutante genet innført i en dikot plante ved plantetransformasjonsmetoder som beskrevet ovenfor.

**Eksempel 8: Produksjon av Herbicidresistente planter ved transformasjon med rasjonelt konstruerte AHAS gener**

**DNA konstruksjoner:**

Rasjonelt konstruerte AHAS variantgener innbefattet i E. coli ekspresjonsvektorene ble  
 20 anvendt som en ren kilde for DNA restriksjonsfragmenter for å erstatte det ekvivalente restriksjonsfragmentet i et Arabidopsis AHAS gen. Dette genet er tilstede i et 5,5 kb genomisk DNA fragment som også inneholder Arabidopsis AHAS promoteren, Arabidopsis AHAS termineringssekvensen og 5'- og 3'-flankerende DNA. Etter DNA sekvensering gjennom mutasjonssetene ble utført for å bekrefte tilstedeværelse av riktig  
 25 mutasjon, ble hele 5,5 kb fragmenter fra hvert plasmid skutt inn i en pBIN basert plante transformasjonsvektor (Mogen, Leiden, Nederland). Plantetransformasjonsvektoren inneholder også neomycinfosfotransferase II (nptII) kanamycinresistensgenet drevet av 35S cauliflower mosaikk virus promoter. Den endelige vektorkonstruksjonen er vist i figur 12. Vektorene inneholdende Arabidopsis AHAS genene med Met124Ile,  
 30 Met124His og Arg199Glu mutasjonene (tilsvarende Met53Ile, Met53His og Arg128Glu mutasjonene i mais AHAS sekvensen er vist i figur 1) ble merket med henholdsvis pJK002, pJK003 og pJK004.

Hver av disse vektorene ble transformert inn i Agrobacterium tumefaciens stammen  
 35 LBA4404 (R&D Life Technologies, Gaithersburg, MD) ved anvendelse av transformasjonsmetoden beskrevet i An et al., Plant Mol. Biol. Manual A3:1-19 (1988).

**Plantetransformasjon:**

Bladskivetransformasjon av *Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin 38 ble utført som beskrevet av Horsch et al. (Science, 227: 1229-1231, 1985) med visse modifikasjoner. Bladskivene ble kuttet fra planter dyrket under sterile betingelser og dyrket sammen opp  
5 ned i Murashige Skoog media (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) i 2-3 dager ved 25°C i mørket med *Agrobacterium tumefaciens* stammer inneholdende plasmidene pJK002, pJK003 eller pJK004. Skivene ble blottet tørre og overført til regenererings Murashige Skoog medium med B5 vitaminer inneholdende 1 mg/l benzyladenin og 0,1 mg/l 1-naftyleddiksyree, 100 mg/l kanamycin og 500 mg/ml cefotaxime (alle oppnådd  
10 fra Sigma).

Transformanter ble innledningsvis selektert ved kanamycin resistens utvist av nptII genet tilstede i transformasjonsvektoren. Skudd avledet fra bladskivene ble tatt ut og plassert på friskt Murashige Skoog hormonfritt medium inneholdende cefotaxime og  
15 kanamycin.

**In vivo Herbicidresistens**

Kanamycinresistente tobakkskudd ble overført til medium inneholdende en 0,25 µm imazethapyr. Ved denne konsentrasjonen av imidazolinonherbicid, hadde ikke-  
20 transformerte tobakkskudd (inneholdende endogen vill-type AHAS) ikke evne til å initiere rotdannelse. I kontrast til dette ble rotinitiering og vekst observert fra tobakkskudd transformert med hver av de mutante AHAS genene. Røttene utviklet fra skudd transformert med Met124Ile og Arg199Glu mutantgener sammen med villtype er vist i figur 1. Planter transformert med Met124Ile eller Arg199Glu mutantgener var resistente  
25 overfor spraying med to ganger feltraten (100 g/ha) av imazethapyr (figur 13). Mønstrene til rotveksten i transformerte vs. ikke-transformerte planter i nærvær av herbicid, samt adferden etter herbicid spraying tyder på at ekspresjon av rasjonelt konstruerte herbicidresistensgener utviser herbicidresistens in vivo.

**30 Deteksjon av rasjonelt konstruerte gener i herbicidresistent tobakk.**

Genomisk DNA ble isolert fra AHAS-transformert tobakkplanter, og tilstedeværelse av Arabidopsis AHAS variantgener ble verifisert ved PCR analyser. Forskjellene mellom nukleotidsekvensene til Arabidopsis AHAS genet og to tobakk AHAS gener ble vurdert  
35 for å konstruere PCR primere som bare amplifiserer Arabidopsis genet i en tobakk-genomisk DNA bakgrunn. Rasjonelt konstruerte herbicid resistens gener ble detektert,

som vist ved amplifikasjon av et DNA fragment med riktig størrelse, i de fleste herbicid resistente plantene. Intet PCR signal fremkom fra ikke-transformerte tobakkplanter.

**Segregasjon av transformerte AHAS gener:**

- 5 For å registrere segregasjonen av rasjonelt konstruerte AHAS gener i transformerte planter ble spiringstester utført. Frøene ble plassert i hormon-fritt Murashige-Skoog medium inneholdende opptil 2,5 µm PURSUIT® og 100 µm kanamycin. Kimplantene som fremkom ble visuelt registrert på resistens eller mottagelighet for herbicid.
- 10 På grunn av at tobakkplanter er diploide er det ventet at avkommet til selv-pollinerte planter ville segregere 3:1 resistente:mottagelige, som reflekterer eksistensen av 1 kimplante som er homozygot for resistant AHAS gen, 2 kimplanter som er heterozygote for resistant AHAS gen og 1 kimplante som mangler et resistant AHAS gen.
- 15 Resultatene indikerte at resistente AHAS gener segregerer i det ventede 3:1 forholdet og understøtter konklusjonen om at herbicidresistens blir utvist av et enkelt, dominant kopi av et rasjonelt konstruert AHAS gen.

Disse resultatene indikerer at rasjonell konstruksjon av herbicid-resistente AHAS gener kan bli anvendt for å produsere planter som utviser herbicidresistent vekst in vivo.

Eksempel 9: Produksjon av planter som er kryss-resistente overfor forskjellige herbicider ved transformasjon med rasjonelt konstruerte AHAS gener

- Tobakkplanter som formert med rasjonelt konstruerte AHAS gener er beskrevet i
- 25 eksempel 8 ovenfor og ble også testet for kryss-resistens overfor et annet herbicid, CL 299,263 (også kjent som imazamox). Spiringstestene ble utført på frø høstet fra primære transformanter inneholdende Met124Ile, Met124His og Arg199Glu Arabidopsis AHAS variantgener, i fravær eller nærvær av 2,5 µm CL 299,263 (figur 15). Denne konsentrasjonen av herbicidet forårsaker alvorlig stunting og bleking av vill-type tobakkplanter.
  - 30 Tobakkplanter transformert med Met124His AHAS genet viste høyest resistensnivå (figur 15). Arg199Glu transformantene viste et mellomliggende resistensnivå, mens Met124Ile viste liten resistens (figur 15).

P a t e n t k r a v

1.

Fremgangsmåte for fremstilling av et imidazolinon- og eller sulfonyleureabasert resistent  
 5 AHAS-variantprotein ved anvendelse av strukturbasert informasjon,  
 k a r a k t e r i s e r t v e d at fremgangsmåten omfatter:

- (a) oppstilling av et mål AHAS-protein på puryvat oksidasetemplet for å avlede den tredimensjonale strukturen til nevnte mål-AHAS-protein;
- 10 (b) utforming av en eller flere imidazolinon- og/eller sulfonyleureabaserte herbicider inn i den nevnte tre-dimensjonale strukturen for å lokalisere en imidazolinon- og/eller sulfonyleureabasert herbicidbindingslomme i nevnte mål-AHAS-protein;
- (c) utvelgelse som et mål for en mutasjon en aminosyreposisjon i nevnte mål-AHAS-protein, der nevnte mutasjon endrer affiniteten til minst et imidazolinon- og/eller sulfonyleureabasert herbicid for nevnte bindingslomme;
- 15 (d) mutering av DNA som koder for nevnte mål-AHAS-protein for å fremstille et mutert DNA som koder for en variant-AHAS inneholdende nevnte mutasjon i nevnte posisjon; og
- (e) uttrykking av nevnte muterte DNA i en første celle, under betingelser hvor nevnte variant-AHAS inneholdende nevnte mutasjon i nevnte posisjon blir  
 20 produsert.

2.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den videre omfatter:

- (f) uttrykking av DNA som koder for vill-type-AHAS parallelt i en andre celle;
- 25 (g) rensing av nevnte vill-type- og nevnte variant-AHAS-proteiner fra nevnte celler;
- (h) analysing av nevnte vill-type- og nevnte variant-AHAS-proteiner for katalytisk aktivitet ved omdanning av puryvat til acetolaktat eller ved kondensering av pyruvat og 2-ketobutyrat for å danne acetohydroksybutyrat, i fravær og i nærvær av nevnte imidazolinon- eller sulfonyleureabaserte herbicid; og
- 30 (i) gjentakelse av trinnene (c)-(h), hvori nevnte DNA kodende for nevnte variant ifølge trinn (e) blir anvendt som AHAS-kodende DNA i trinn © helt til et imidazolinon-trinn (e) blir anvendt som AHAS-kodende DNA i trinn (c) helt til et imidazolinon- eller sulfonyleureabasert herbicidresistent AHAS-variantprotein er identifisert som har:
- 35 i fravær av nevnte imidazolinon- eller sulfonyleureabaserte herbicid,
  - (a) en katalytisk aktivitet som alene er tilstrekkelig for å opprettholde levedyktigheten til en celle hvori den blir uttrykt; eller

- (b) katalytisk aktivitet i kombinasjon med et hvilket som helst imidazolinon- eller sulfonylureabasert herbicidresistent AHAS-variantprotein som også blir uttrykt i nevnte celle, som kan være den samme eller forskjellig fra nevnte første AHAS-variantprotein, tilstrekkelig for å opprettholde levedyktigheten til en celle som den blir uttrykt i; hvori nevnte celle krever AHAS-aktivitet for levedyktighet; og
- (ii) katalytisk aktivitet som er mer resistent overfor minst et imidazolinon- eller sulfonylurea herbicid enn vill-type-AHAS.

10

3.

Fremgangsmåte ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte katalytiske aktivitet i fravær av et imidazolinon- eller sulfonylureabasert herbicid er mer enn 20% av den katalytiske aktiviteten til nevnte vill-type-AHAS i fravær av et imidazolinon- eller sulfonylureabasert herbicid.

15

4.

Fremgangsmåte ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at herbicidet er et imidazolinonherbicid og nevnte herbicidresistente AHAS-variantprotein har:

20

- (i) katalytisk aktivitet i fravær av nevnte herbicid på mer enn omtrent 20% av den katalytiske aktiviteten i nevnte vill-type-AHAS;
- (ii) katalytisk aktivitet som er mer resistent overfor tilstedeværelse av imidazolinon herbicider sammenlignet med vill-type-AHAS; og
- (iii) katalytisk aktivitet som er mer sensitiv overfor tilstedeværelse av sulfonylureaherbicider sammenlignet med imidazolinonherbicider.

25

5.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte mål-AHAS-protein er avledet fra *Arabidopsis thaliana*.

30

6.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte første celle er *E.coli*.

35

7.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte første og andre celler er *E.coli*.

8.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved at nevnte mål-AHAS-protein omfatter et protein med sekvensen SEQ ID No.1 eller aminosyresekvensen til et annet plante-AHAS-protein.

5

9.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved at nevnte mutasjon er en substitusjon av minst en forskjellig aminosyrerest ved en aminosyrerest ifølge sekvensen vist i SEQ ID No.1 utvalgt fra gruppen bestående av F135, M53, R128 og en aminosyrerest fra et annet plante-AHAS-protein ved en aminosyre oppstilt med en hvilken som helst av de foregående, og en hvilken som helst kombinasjon av en hvilken som helst av de foregående.

10

10.

Fremgangsmåte ifølge krav 9, karakterisert ved at nevnte substitusjon blir valgt fra gruppen bestående av Met53Trp, Met53Glu, Met53Ile, Met53His, Arg128Ala, Arg128Glu, Phe135Arg eller en kombinasjon av hvilke som helst av de foregående.

15

11.

Isolert DNA kodende for et acetohydroksyresyntase (AHAS)-variantprotein, karakterisert ved at variantproteinet omfatter et AHAS-protein modifisert ved substitusjon at minst en forskjellig aminosyrerest ved en aminosyrerest i sekvensen vist i SEQ ID No.1 utvalgt fra gruppen bestående av M53, R128, F135 og en hvilken som helst kombinasjon av hvilke som helst av de foregående.

25

12.

DNA ifølge krav 11, karakterisert ved at modifiseringen endrer evnen et imidazolinon- og/eller sulfonylureabasert herbicid har til å inhibere den enzymatiske aktiviteten til nevnte protein.

30

13.

DNA ifølge krav 12, karakterisert ved at nevnte AHAS-protein er avledet fra *Arabidopsis thaliana*.

35

14.

DNA ifølge krav 13, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte substitusjon blir valgt fra gruppen bestående av Met53Trp, Met53Glu, Met53Ile, Met53His, Arg128Ala, Arg128Glu, Phe135Arg, eller en kombinasjon av hvilke som helst av de foregående.

5

15.

DNA ifølge krav 14, k a r a k t e r i s e r t v e d at at nevnte variant-AHAS-protein har i fravær av minst et imidazolinon- eller sulfonyleureabasert AHAS- inhiberende herbicid,

- 10 (i) en katalytisk aktivitet som alene er tilstrekkelig for å opprettholde levedyktigheten til en celle hvori det blir uttrykt; eller
- (ii) katalytisk aktivitet i kombinasjon med et hvilket som helst annet imidazolinon- eller sulfonyleureabasert herbicidresistent AHAS-variantprotein som også blir uttrykt i nevnte celle, som kan være det samme som eller forskjellig fra nevnte AHAS-variantprotein,
- 15 tilstrekkelig for å opprettholde levedyktigheten til en celle som den det blir uttrykt i;
- hvori nevnte celle krever AHAS-aktivitet for levedyktighet; og
- (iii) katalytisk aktivitet som er mer resistent overfor minst et imidazolinon- eller sulfonyleureabasert herbicid eller vill-type-AHAS.
- 20

16

DNA ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte variant-AHAS har mer enn 20% av den katalytiske aktiviteten til vill-type-AHAS.

25

17.

DNA ifølge krav 16, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte variant-AHAS er mer resistent overfor imidazolinonbaserte herbicider enn ovenfor sulfonyleureabaserte herbicider.

30

18.

DNA-vektor, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter DNA-sekvensen ifølge krav 11 operabelt koblet til et transkripsjonsregulatorisk element.

35

19.

Celle, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter en AHAS-kodende DNA-sekvens avledet fra en DNA-vektor ifølge krav 18, hvori nevnte celle blir utvalgt fra gruppen bestående av bakterielle, sopp, plante, insekt og pattedyrceller.

5

20.

Celle ifølge krav 19, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter en plantecelle.

21.

10 Celle transformert med et DNA ifølge krav 12, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte DNA uttrykkes i nevnte celle slik at det utviser imidazolinon- og/eller sulfonyleureabasert herbicidresistens på nevnte celle.

22.

15 Frø, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter en celle som definert i krav 20.

23.

Variant-AHAS-protein, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter et protein kodet av et DNA som definert i krav 11.

20

24.

Variant-AHAS-protein ifølge krav 23, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte substitusjon blir valgt fra gruppen bestående av Met53Trp, Met53Glu, Met53Ile, Met53His, Arg128Ala, Arg128Glu, Phe135Arg, eller en kombinasjon av hvilke som helst av de  
25 foregående.

25.

Variant-AHAS-protein ifølge krav 23, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte variant-AHAS-protein har

30

(a) i fravær av nevnte ene AHAS-inhiberende imidazolinon- eller sulfonyleureabaserte herbicid,

(i) en katalytisk aktivitet alene som er tilstrekkelig for å opprettholde levedyktigheten til en celle som den blir uttrykt; eller

35

(ii) katalytisk aktivitet i kombinasjon med et hvilket som helst andre

herbicidresistent AHAS-variantprotein som også blir uttrykt i nevnte

celle, som kan være den samme som eller forskjellig fra nevnte AHAS-

variantprotein, tilstrekkelig for å opprettholde levedyktigheten til en celle

som det blir uttrykt i; hvori nevnte celle krever AHAS-aktivitet for levedyktighet; og

(b) katalytisk aktivitet som er mer resistent overfor minst et imidazolinon- eller sulfonyleureabasert herbicid enn vill-type-AHAS.

5

26.

Variant-AHAS-protein ifølge krav 23, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte variant AHAS har mer enn 20% av den katalytiske aktiviteten til vill-type-AHAS.

10 27.

Fremgangsmåte for å frembringe imidazolinon- og/eller sulfonyleureabasert herbicidresistens i en celle, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter:

(a) kloning av et DNA som definert ifølge krav 11 inn i en kompatibel ekspresjonsvektor; og

15

(b) transformering av nevnte DNA inn i nevnte celle, under betingelser hvori nevnte gen blir uttrykt i tilstrekkelige nivåer for å utvise herbicidresistens på nevnte celle.

28.

20 Fremgangsmåte ifølge krav 27, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte muterte gen koder for en annen aminosyre i minst en av posisjonene 53, 128, 135 eller kombinasjoner derav.

29.

25 Fremgangsmåte ifølge krav 28, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte AHAS-gen omfatter Arabidopsis thaliana-genet.

30.

30 Fremgangsmåte ifølge krav 28, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte celle er en plantecelle.

31.

Fremgangsmåte ifølge krav 30, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte celle er et frø.

35 32.

Fremgangsmåte for å kontrollere ugress i en avling, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter dyrking av en avling omfattende imidazolinon- og/eller sulfonyleureabaserte

herbicidresistente planter omfattende celler som definert i krav 19, og behandling av nevnte avling med nevnte imidazolinon- og/eller sulfonylureabasert herbicid.

33.

- 5 Fremgangsmåte for å kontrollere ugress i en avling, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter dyrking av en avling omfattende imidazolinon- og/eller sulfonylureabaserte herbicidresistente planter omfattende celler som definert i krav 19, og behandling av nevnte avling med nevnte imidazolinon- og/eller sulfonylureabaserte herbicidsammensetning inkludert nevnte herbicid.

A

\*1 \* CSAASPAMP\*10 \*MAPPATPLRP\*20 \*WGFTDPRKGA\*

\*60 \*TRSPVIANHL\*70 \*FRHEQGEAFA\*80 \*ASGYARSSGR\*

Arg128 Phe135

\*120\*AITGQVPRRM\*130\*IGTDAFQETP\*140\*IVEVTRSITK\*

\*180\*LVDIPKDIQQ\*190\*QMAVPVWDKP\*200\*MSLPGYIARL\*

\*240\*ARSCEELRRF\*250\*VELTGIPTT\*260\*TLKQLGNFPS\*

\*300\*GVRFDDRVTG\*310\*KIEAFASRAK\*320\*IVIVDIDPAE\*

\*360\*SKKSFDFGSW\*370\*NDELDDQKRE\*380\*FPLGYKTSNE\*

\*420\*WAAQYYTYKR\*430\*PRQWLSSAGL\*440\*GAMGFGLPAA\*

\*480\*IRIENLPVKV\*490\*FVLNNQIILGH\*500\*VVQWEDRFYK\*

[ 1 ]

\*540\*PAVRVTKKNE\*550\*VRAAIKKMLE\*560\*TPOPYLLDII\*

A

FIG. 1a

Met 53

A 30 \*DILVESLERC\*40 \*GVRDVFAYPG\*50 \*GASMEIHQAL  
90 \*VGVCIAATSGP\*100 \*GATNLVSALA\*110 \*DALLDSVPMV  
150 \*HNYLVLDVDD\*160 \*IPRVVQEAFF\*170 \*LASSRPGPV  
210 \*PKPPATELLE\*220 \*QVLRVLGSR\*230 \*RPVLYVGGGC  
270 \*DDPLSLRMLG\*280 \*MIGTVYANYA\*290 \*VDKADLLLAL  
330 \*IGKNKQPHVS\*340 \*ICADVLLALQ\*350 \*GMNALLEGST  
390 \*EIQPQYAIQV\*400 \*LDELTKGEAI\*410 \*IGTGVGQHQM  
450 \*AGASVANPGV\*460 \*TVVDIDGDGS\*470 \*FLMNVQELAM  
510 \*ANRAHTYLGN\*520 \*PENESEIYPD\*530 \*FVTIAKGFNI  
570 \*VPHQEIVLPM\*580 \*IPSGOAFKDM\*590 \*ILDGDRITVY  
A

FIG. 1b







FIG. 3b

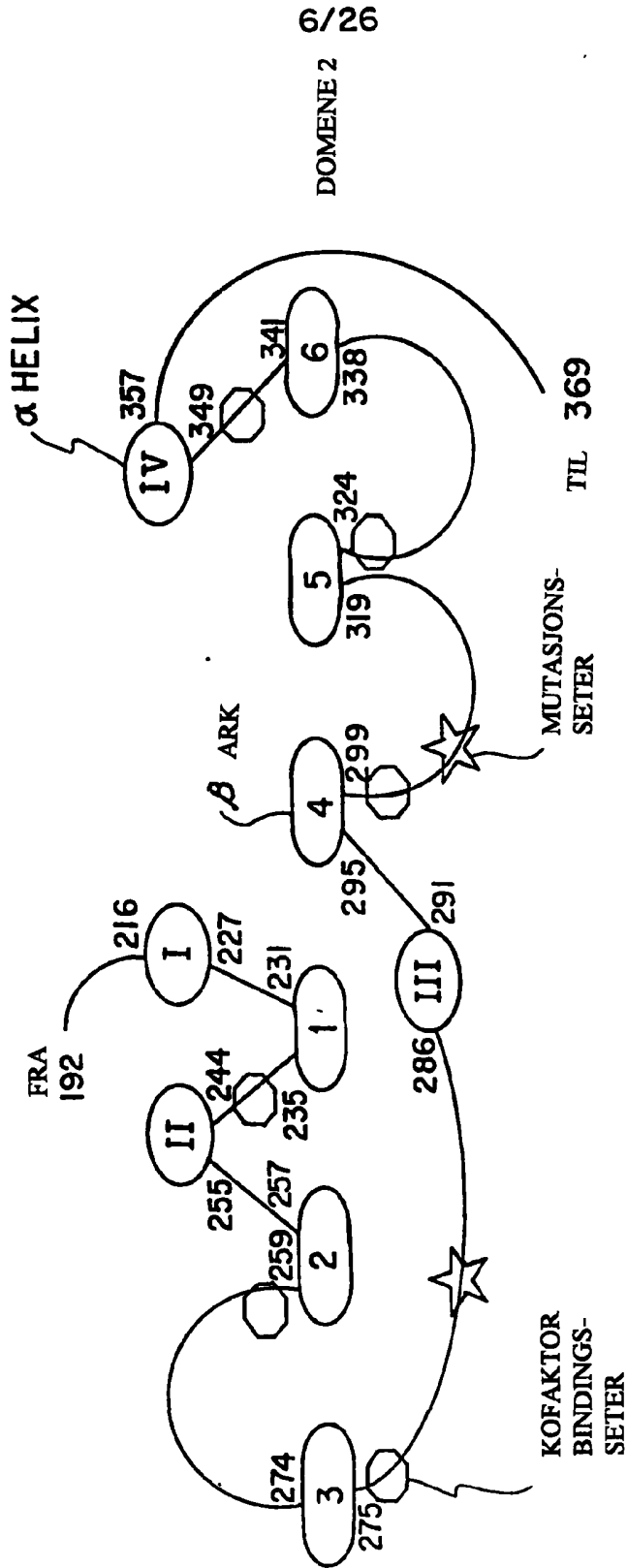


FIG. 3C

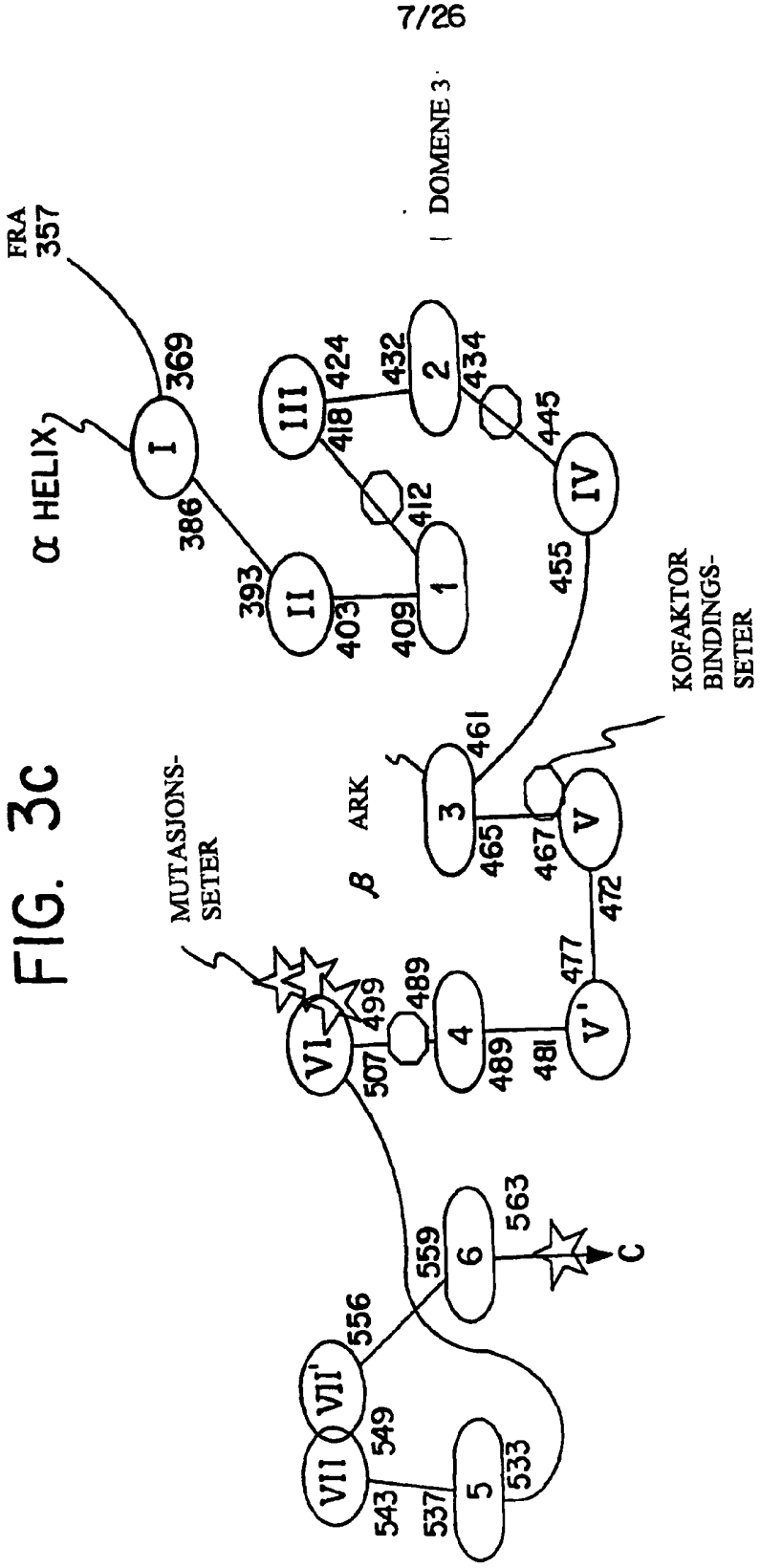
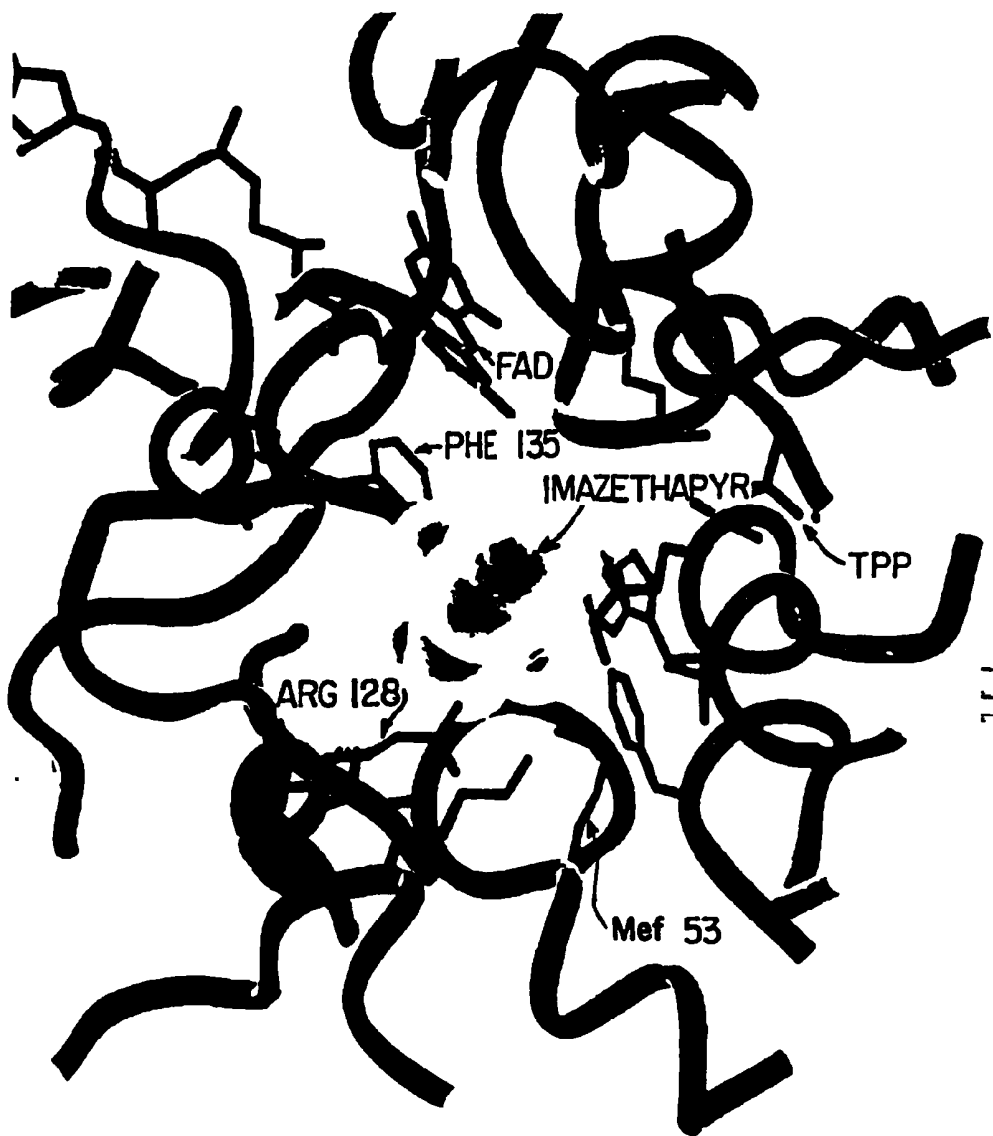


FIG. 4



# FIG. 5a

1  
 Pac751 .....  
 Maizeals2 .....  
 Maizeals1 .....  
 Tobac1 MAAA...APS PSSSAFSKTL SPSSSTSTL ..MATAAAS TALTGATTAA  
 Tobac2 MAAA...AAA PSPS.FSKTL SSSSKSSTL ..MATAATAA AALTGATTAT  
 Athcsr12 MAAATTTT TS SSSISFSTKP SPSSSKSPLP ISRFSLPFSL NPNKSSSSSR  
 Bnaal3 MAAA...TS SSPISLTAKP S...SSKSPLP ISRFSLPFSL TPQKFPSSRLH  
 Bnaal2 .....M ASFSFFGTIP S.....SPTK ASVFSLPVSV TTLPSFPRRR  
 Consensus MAAA--ATS -S-SSFS--P SPSSSKSPT- -SRFTLPFS- TPLK--P--

50

9/26

51  
 Pac751 .....  
 Maizeals2 PKARRRAHL ATRRALAAPI .....  
 Maizeals1 PKARRRAHL ATRRALAAPI RCSALSRA TP TAPPATPLRP WGPNEPRKGS  
 Tobac1 HLTHTHIH SORRRFTISN VISTNQKVSQ TEKTETVSR FAPDEPRKGS  
 Tobac2 HLTPT..HIH SORRRFTISN VISTNQKVSQ TQKAETVSR FAPDEPRKGS  
 Athcsr12 RRGIKSSSPS SISAVLNTTT NVTTTPSPTK PTKPETFISR FAPDQPRKGA  
 Bnaal3 R.....PL AISAVLNSPV NV....APEK TDKIKTFISR YAPDEPRKGA  
 Bnaal2 .....AT RVSVSANSKK DQDRAS..R RENPSTFSSK YAPNVPRSGA  
 Consensus --TR-RAH-L -IRR-LN-PI --S-TS-A-P T-KP-TF-SR -APDEPRKGA

100

A



# FIG. 5c

B ————— B

EKVIVALENT MED MAIS PHE 135

	201						250
Pac751	IGTDAFQETP	IVEVTR	SITK	HNYLVLDVDD	IPRVVQE	AFF	LASSGRPGPV
Maizeals2	IGTDAFQETP	IVEVTR	SITK	HNYLVLDVDD	IPRVVQE	AFF	LASSGRPGPV
Maizeals1	IGTDAFQETP	IVEVTR	SITK	HNYLVLDVDD	IPRVVQE	AFF	LASSGRPGPV
Tobac1	IGTDAFQETP	IVEVTR	SITK	HNYLVMDVED	IPRVVRE	AFF	LARSGRPGPI
Tobac2	IGTDAFQETP	IVEVTR	SITK	HNYLVMDVED	IPRVVRE	AFF	LARSGRPGPV
Athcsr12	IGTDAFQETP	IVEVTR	SITK	HNYLVMDVED	IPRIIEE	AFF	LATSGRPGPV
Bnaal3	IGTDAFQETP	IVEVTR	SITK	HNYLVMDVDD	IPRIVQE	AFF	LATSGRPGPV
Bnaal2	IGTMAFQETP	VVEVTR	TITK	HNYLVMEVDD	IPRIVRE	AFF	LATSVRPGPV
Consensus	IGTDAFQETP	IVEVTR	SITK	HNYLVMDVDD	IPRVVQE	AFF	LA-SGRPGPV

	251						300
Pac751	LVDIPKDIQQ	QMAVPV	WDKP	MSLPGYIARL	PKPPATE	LLE	QVLRVLVGESR
Maizeals2	LVDIPKDIQQ	QMAVPV	WDKP	MSLPGYIARL	PKPPATE	LLE	QVLRVLVGESR
Maizeals1	LVDIPKDIQQ	QMAVPV	AWDTP	MSLPGYIARL	PKPPATE	FLE	QVLRVLVGESR
Tobac1	LIDVPKDIQQ	QLVIPD	WDQP	MRLPGYMSRL	PKLPNEM	LLE	QIVRLISESK
Tobac2	LIDVPKDIQQ	QLVIPD	WDQP	MRLPGYMSRL	PKLPNEM	LLE	QIVRLISESK
Athcsr12	LVDVPKDIQQ	QLAIPN	WEQA	MRLPGYMSRM	PKPPED	SHLE	QIVRLISESK
Bnaal3	LVDVPKDIQQ	QLAIPN	WDQP	MRLPGYMSRL	PQPPEV	SQLG	QIVRLISESK
Bnaal2	LIDVPKDVQQ	QFAIPN	WEQP	MRLPLYMSTM	PKPPKV	SHLE	QILRLVSESK
Consensus	LVDVPKDIQQ	QLAIPN	WDQP	MRLPGYMSRL	PKPPA	- - LLE	QI-RL-SESK

————— C

# FIG. 5d

		C	
			350
Pac751	RPVLYVGGGC	ARSGEELRRF	VELTGIPVTT
Maizeals2	RPVLYVGGGC	AASGEELRRF	VELTGIPVTT
Maizeals1	RPVLYVGGGC	AASGEELCRF	VELTGIPVTT
Tobac1	KPVLVYVGGC	SQSEDLRRF	VELTGIPVAS
Tobac2	KPVLVYVGGC	SQSSEELRRF	VELTGIPVAS
Athcsr12	KPVLVYVGGC	LNSDELGRF	VELTGIPVAS
Bnaal3	RPVLVYVGGG	LNSSEELGRF	VELTGIPVAS
Bnaal2	RPVLVYVGGC	LNSSEELRRF	VELTGIPVAS
Consensus	RPVLYVGGGC	-NSSEELRRF	VELTGIPVAS
			351
			400
Pac751	GMHGTVYANY	AVDKADLLLA	LGVRFDLDRVT
Maizeals2	GMHGTVYANY	AVDKADLLLA	LGVRFDLDRVT
Maizeals1	GMHGTVYANY	AVDKADLLLA	FGVRFDLDRVT
Tobac1	GMHGTVYANY	AVDSSDLLLA	FGVRFDLDRVT
Tobac2	GMHGTVYANY	AVDSSDLLLA	FGVRFDLDRVT
Athcsr12	GMHGTVYANY	AVEHSDLLLA	FGVRFDLDRVT
Bnaal3	GMHGTVYANY	AVEHSDLLLA	FGVRFDLDRVT
Bnaal2	GMHGTVYANY	AVEYSDLLLA	FGVRFDLDRVT
Consensus	GMHGTVYANY	AVDKSDLLLA	FGVRFDLDRVT
			D

FIG. 5e

D \_\_\_\_\_ D

401  
 Pac751 EIGKNKQPHV SICADVKLAL QGMNALLEGS TSKKSDFDGS WNDLDDQQR 450  
 Maizeals2 EIGKNKQPHV SICADVKLAL QGMNALLEGS TSKKSDFDGS WNDLDDQQR  
 Maizeals1 EIGKNKQPHV SICADVKLAL QGMNTLLEGS TSKKSDFDGS WHDELDDQQR  
 Tobac1 EIGKNKQPHV SICADIKLAL QGLNSILESK EGKCLKDFSA WRQELTEQKV  
 Tobac2 EIGKNKQPHV SICADIKLAL QGLNSILESK EGKCLKDFSA WRQELTVQKV  
 Athcsr12 EIGKNKTPHV SVCGDVKLAL QGMNKVLENR AEELKLDFGV WRNELNVQKQ  
 Bnaa13 EIGKNKTPHV SVCGDVKLAL QGMNKVLENR AEELKLDFGV WRSELSEQKQ  
 Bnaa12 EIGKNKTPHV SVCCDVQLAL QGMNEVLENR RD . . VLDFGE WRCELNEQRL  
 Consensus EIGKNKQPHV SICADVKLAL QGMN-VLE - - T-KLKLDFGS WRDELD-QKR

13/26

451  
 Pac751 EFPLGYKTSN EEIQPQYAIQ VLDELTKGEA IIGTGVGQHQ MWAAQYYTYK 500  
 Maizeals2 EFPLGYKTSN EEIQPQYAIQ VLDELTKGEA IIGTGVGQHQ MWAAQYYTYK  
 Maizeals1 EFPLGYKIFN EEIQPQYAIQ VLDELTKGEA I IATGVGQHQ MWAAQYYTYK  
 Tobac1 KHPLNFKTFG DAIPQYAIQ VLDELTKGNA IISTGVGQHQ MWAAQYYKYR  
 Tobac2 KYPLNFKTFG DAIPQYAIQ VLDELTKGSA IISTGVGQHQ MWAAQYYKYR  
 Athcsr12 KFPLSFKTFG EAIPQYAIK VLDELTDGKA IISTGVGQHQ MWAAQFYNYK  
 Bnaa13 KFPLSFKTFG EAIPQYAIQ VLDELTKGKA IISTGVGQHQ MWAAQFYKYR  
 Bnaa12 KFPLRYKTFG EEIPQYAIQ LDELTDGKA IITTVGQHQ MWAAQFYRFK  
 Consensus KFPLG-KTFG E-IPQYAIQ VLDELTKG-A IISTGVGQHQ MWAAQYY-YK

E \_\_\_\_\_ E

# FIG. 5f

E \_\_\_\_\_ E

	501			550
Pac751	RPRQWLSSAG	LGAMGFGLPA	AAGASVANPG	VTVVDIDGDG SFLMNVQELA
Maizeals2	RPRQWLSSAG	LGAMGFGLPA	AAGASVANPG	VTVVDIDGDG SFLMNVQELA
Maizeals1	RPRQWLSSAG	LGAMGFGLPA	AAGAAVANPG	VTVVDIDGDG SFLMNIQELA
Tobac1	KPRQWLSSAG	LGAMGFGLPA	AIGAAVGRPD	EVVVDIDGDG SFIMNVQELA
Tobac2	KPRQWLSSAG	LGAMGFGLPA	AIGAAVGRPD	EVVVDIDGDG SFIMNVQELA
Athcsr12	KPRQWLSSAG	LGAMGFGLPA	AIGASVANPD	AIVVDIDGDG SFIMNVQELA
Bnaal3	KPRQWLSSAG	LGAMGFGLPA	AIGASVANPD	AIVVDIDGDG SFIMNVQELA
Bnaal2	KPRQWLSSAG	LGAMGFGLPA	AMGAAIANPG	AVVVDIDGDG SFIMNIQELA
Consensus	KPRQWLSSAG	LGAMGFGLPA	AIGA-VANP -	-VVVDIDGDG SFIMNVQELA

14/26

	551			600
Pac751	MIRIENLPVK	VFVLLNNQHLLG	MVVQWEDRFY	KANRAHTYLG NPENESEIYP
Maizeals2	MIRIENLPVK	VFVLLNNQHLLG	MVVQWEDRFY	KANRAHTYLG NPENESEIYP
Maizeals1	MIRIENLPVK	VFVLLNNQHLLG	MVVQWEDRFY	KANRAHTYLG NPENESEIYP
Tobac1	TIKVENLPVK	IMLLNNQHLLG	MVVQWEDRFY	KANRAHTYLG NPSNEAEIYP
Tobac2	TIKVENLPVK	IMLLNNQHLLG	MVVQWEDRFY	KANRAHTYLG NPSNEAEIYP
Athcsr12	TIRVENLPVK	VLLNNQHLLG	MVMQWEDRFY	KANRAHTYLG DPAQEDEIYP
Bnaal3	TIRVENLPVK	ILLNNQHLLG	MVMQWEDRFY	KANRAHTYLG DPARENEIYP
Bnaal2	TIRVENLPVK	VLLNNQHLLG	MVLQWEDHFY	AANRADSFLG DPANPEAVFP
Consensus	TIRVENLPVK	V-LLNNQHLLG	MVVQWEDRFY	KANRAHTYLG NP-NESEIYP

F \_\_\_\_\_ F

FIG. 5g

F \_\_\_\_\_ F

	601		650
Pac751	DFVTIAKGFN	IPAVRVTKKN	EVRAAIKKML
Maizeals2	DFVTIAKGFN	IPAVRVTKKN	EVRAAIKKML
Maizeals1	DFVAIAKGFN	IPAVRVTKKS	EVHAAIKKML
Tobac1	NMLKFAEACG	VPAARVTHRD	DLRAAIQKML
Tobac2	NMLKFAEACG	VPAARVTHRD	DLRAAIQKML
Athcsr12	NMLLFAAACG	IPAAARVTKKA	DLREAIQTML
Bnaal3	NMLQFAGACG	IPAAARVTKKE	ELREAIQTML
Bnaal2	DMLLFAASCG	IPAAARVTRRE	DLREAIQTML
Consensus	-ML-FAKACG	IPAAARVTKK-	-LRAAIQKML

ETPGPYLLDI IVPHQEHVLP  
ETPGPYLLDI IVPHQEHVLP  
EAPGPYLLDI IVPHQEHVLP  
DTPGPYLLDV IVPHQEHVLP  
DTPGPYLLDV IVPHQEHVLP  
DTPGPYLLDV ICPHQEHVLP  
DTPGPYLLDV ICPHQEHVLP  
DTPGPFLLDV VCPHQDHDVLP  
DTPGPYLLDV IVPHQEHVLP

	651		673
Pac751	MIPSGGAFKD	MILDGDGRTV	Y..
Maizeals2	MIPSGGAFKD	MILDGDGRTV	Y*.
Maizeals1	MIPSGGAFKD	MILDGDGRTV	Y*.
Tobac1	MIPSGGAFKD	VITEGDGRSS	Y*.
Tobac2	MIPSGGAFKD	VITEGDGRSS	Y*.
Athcsr12	MIPNGGTFND	VITEGDGRK	Y*E
Bnaal3	MIPSGGTFKD	VITEGDGRTK	Y*.
Bnaal2	LIPSGGTFKD	IIV*.....	...
Consensus	MIPSGGAFKD	VITEGDGRTV	Y--

\_\_\_\_\_ G

# FIG. 5h

G \_\_\_\_\_ G

Pac751 - maus als2 AHAS isozym som uttrykt fra pAC751 E coli

Ekspresjonsvektor (samme som figur 1)

Maizeals2 - maize als2 AHAS isozym (plante)  
Maizeals1 - maize als1 AHAS isozym (plante)  
Tobac1 - tobacco AHAS SuRA isozym (plante)  
Tobac2 - tobacco AHAS SuRB isozym (plante)  
Athcsr12 - Arabidopsis thaliana Csr 1.2 AHAS gene (plante)  
Bnaal3 - Brassica napus AHAS III isozym (plante)  
Bnaal2 - Brassica napus AHAS II isozym (plante)

FIG. 6

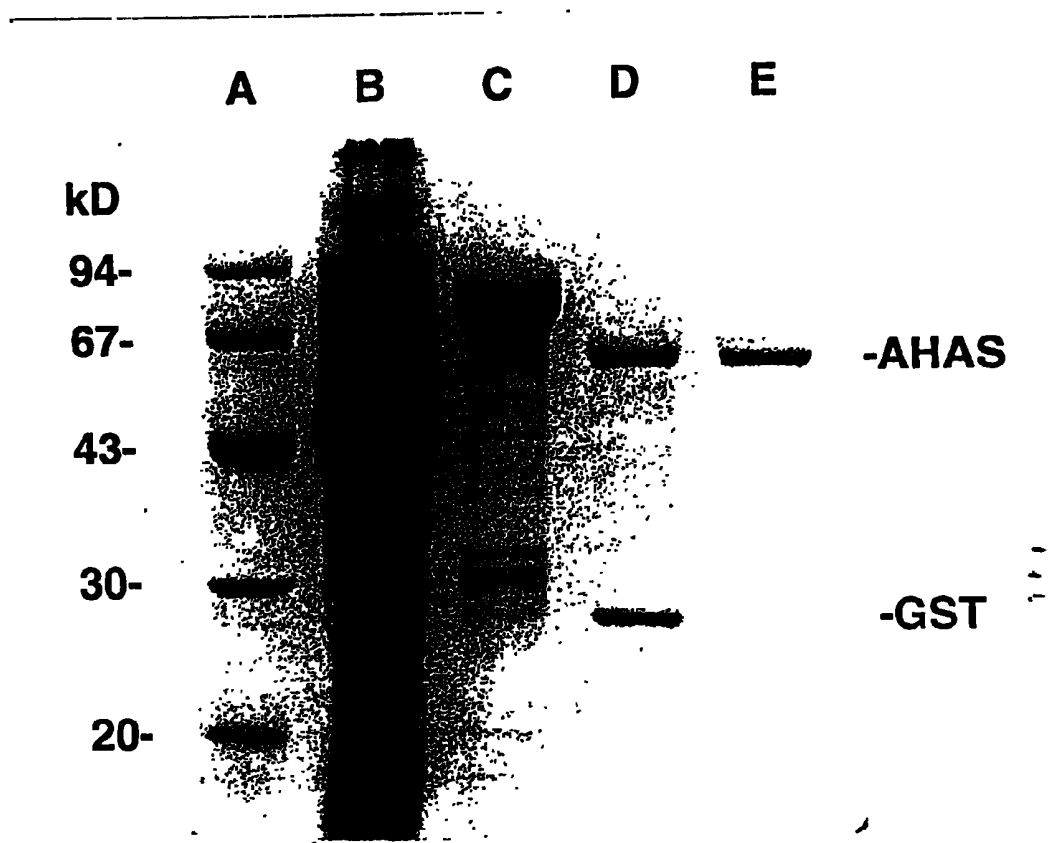


FIG. 7

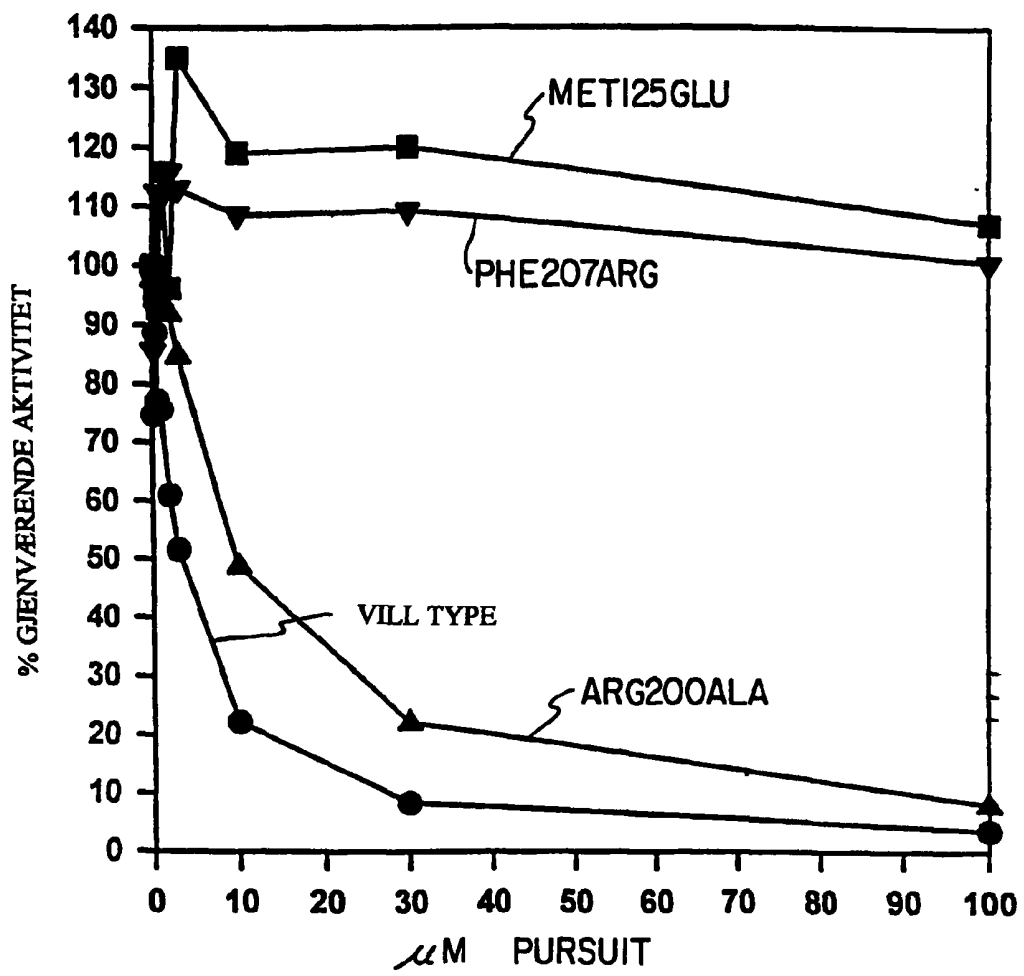


FIG. 8

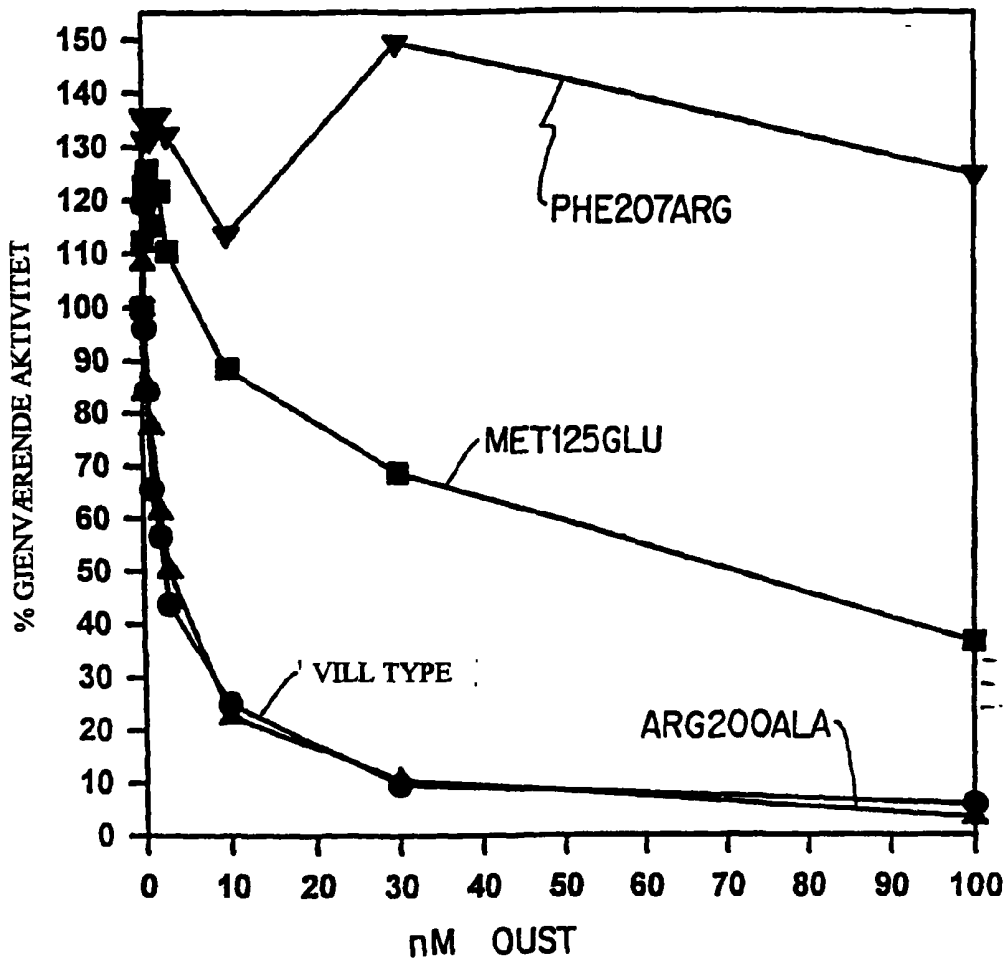


FIG. 9

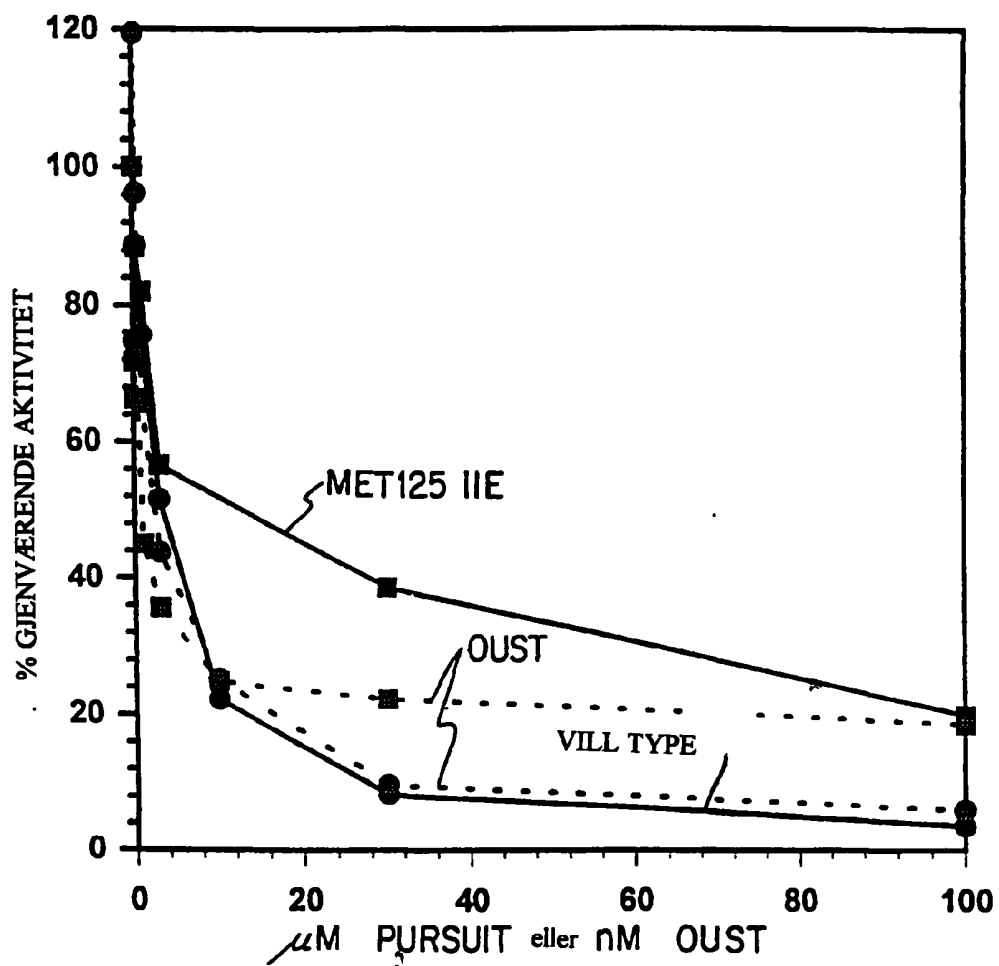


FIG. 10

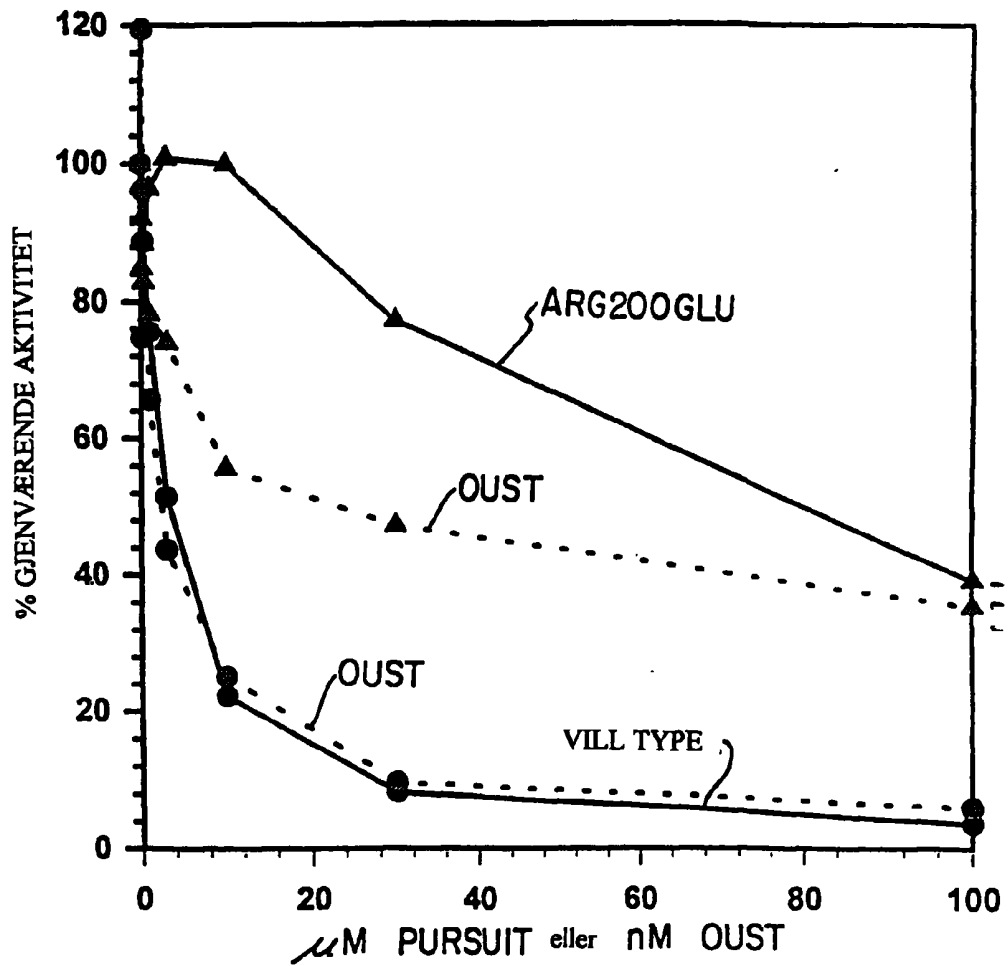


FIG. 11

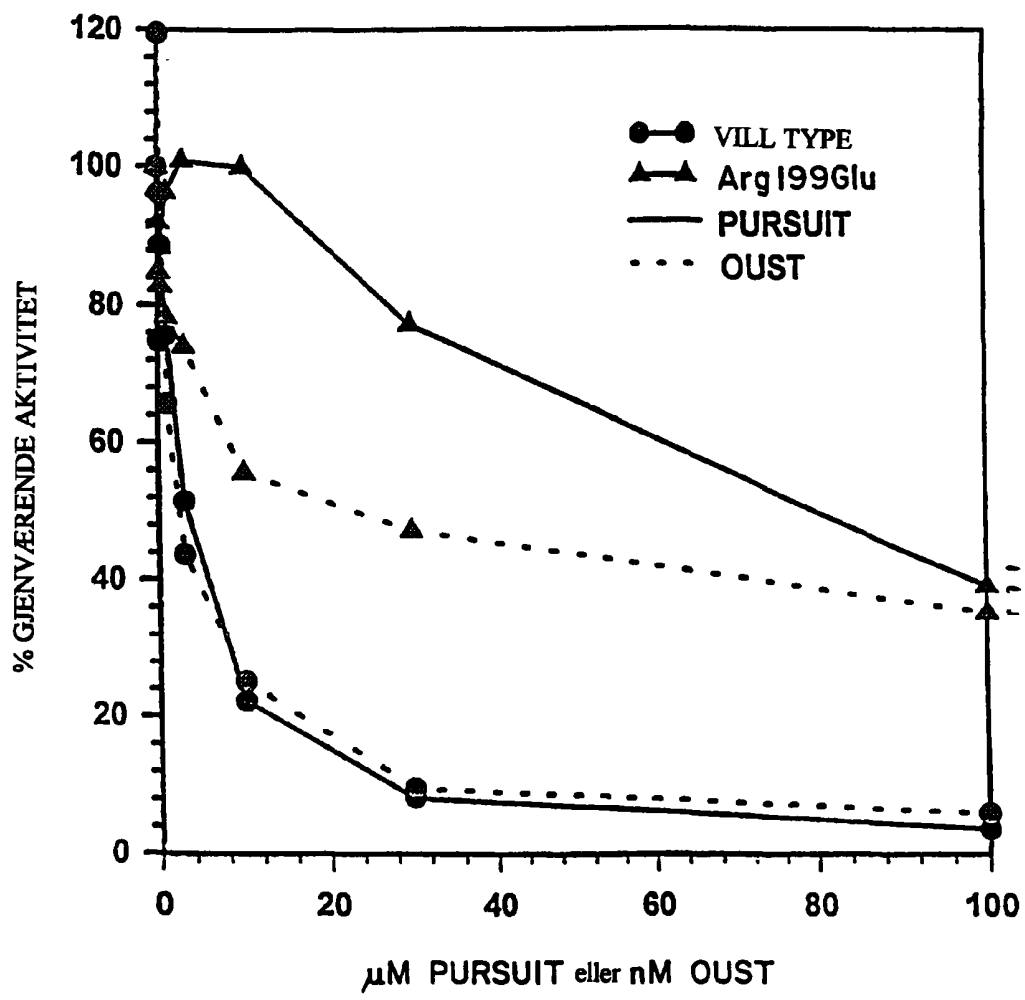


FIG. 12

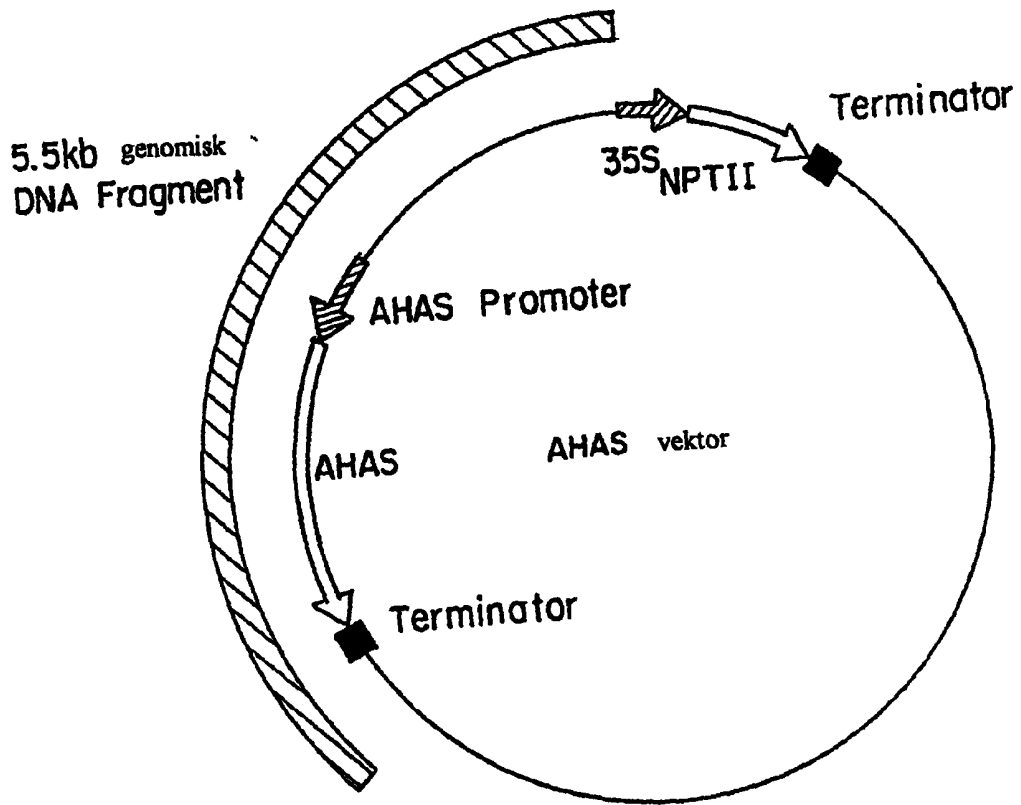
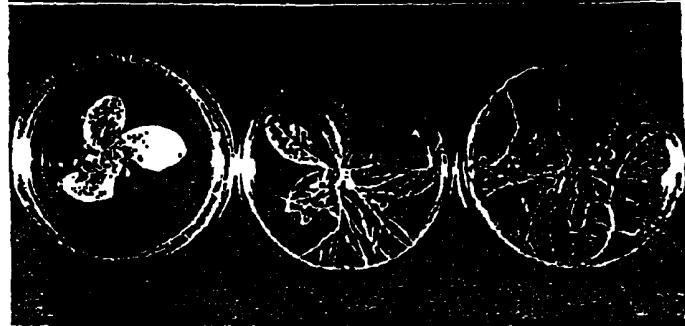


FIG. 13

SETT OVENFRA



SETT NEDENFRA



VILLTYPE

Met124Ile

Arg 199Glu

FIG. 14

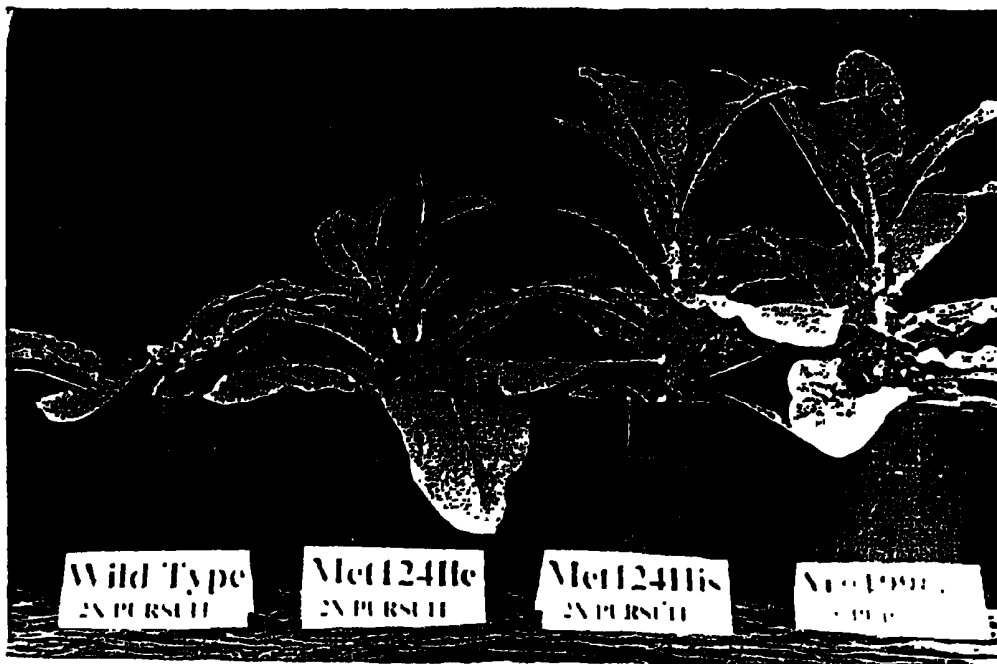


FIG. 15

