

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

3317-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **19. 04. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **20.04.95, 31.05.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/426125, 95/455355**

(33) Země priority: **US, US**

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

(86) PCT číslo: **PCT/US96/05782**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/33270**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N	15/00
C 12 N	9/88
A 01 H	5/00
A 01 H	5/10

(71) Přihlášovatel:

**AMERICAN CYANAMID COMPANY, Madison,
NJ, US;**

(72) Původce:

**Takefuda Genichi, Yardley, PA, US;
Ott Karl Heinz, Lawrenceville, NJ, US;
Kwagh Jae Gyu, Fairless Hills, PA, US;
Stockton Gerald W., Yardley, PA, US;**

(74) Zástupce:

**Zelený Pavel JUDr., Hálkova 2, Praha 2,
12000;**

(54) Název přihlášky vynálezu:

Produkty rezistentní na herbicidy vyvíjené na struktuře založeným způsobem

(57) Anotace:

Jsou popsány na struktuře založené způsoby modelování pro přípravu variant kyselina hydroxyoctová syntéasy včetně těch, které vykazují selektivní zvýšení rezistence na herbicidy jako jsou imidazolinové herbicidy a AHAS inhibující herbicidy. Vynález zahrnuje izolované DNA, kódující takové varianty, vektory, které obsahují DNA a způsoby pro produkci variantních polypeptidů a rostlin rezistentních na herbicidy obsahujících specifické mutace AHAS genu. Také jsou poskytnuty způsoby pro kontrolu plevelu v plodinách.

CZ 3317-97 A3

Produkty rezistentní na herbicidy vyvíjené na struktuře založeným způsobem

Oblast techniky

Tento vynález se týká na struktuře založeného modelování a vývoje variant kyselina hydroxyoctová syntetasy (AHAS), které jsou rezistentní na imidazoliny a jiné herbicidy, AHAS inhibující herbicidy, jejich AHAS variant, DNA kodující tyto varianty, rostlin, které expresují tyto varianty a metody pro zvládání plevelu.

Dosavadní stav techniky

Kyselina hydroxyoctová syntetasa (AHAS) je enzym, který katalyzuje počáteční krok v biosyntese isoleucinu, leucinu a valinu u bakterií, kvasinek a rostlin. Například, zralá AHAS od Zea Mays je přibližně 599-aminokyselinový protein, který je lokalizován na chloroplastech (viz obrázek 1). Enzym využívá thiamin pyrofosfát (TPP) a flavin adenin dinukleotid (FAD) jako kofaktory a pyruvát jako kofaktory pro vytvoření acetolaktátu. Enzym také katalyzuje kondenzaci pyruvátu a 2-ketobutyrate za tvorby acetohydroxybutyrátu. AHAS je také známá jako acetolaktát syntetasa nebo acetolaktát pyruvát lyasa (karboxylační) a je označen jako EC 4.1.3.18. Aktivní enzym je pravděpodobně alespoň homodimer. Ibdah et al., (Protein Science 3: 479 - S, 1994), v abstraktech, popisuje jeden model pro aktivní místo AHAS.

Mnoho herbicidů včetně imidazolinonových sloučenin jako je imazethapyr (PURSUIT[®] - American Cyanamid Company - Wayne, NJ), na sulfonylmočovinně založených sloučenin jako je sulfometuron

05.01.98

methyl (OUSTR[®] - E.I. du Pont de Nemours and Company
 - Wilmington, DE), triazolopyrimidinových sulfonamidů
 (Broadstrike[™] - Dow Elanco; viz Gerwick et al., Pestic. Sci.
 29: 357 - 364, 1990), sulfamoylmočovín (Rodaway et al.,
 Mechanisms of Selectivity of Ac 322, 140 v Paddy Rice, Wheat and
 Barley, Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference
 - Weeds, 1993), pyrimidyl-oxy-benzoových kyselin (Stable[®]
 - Kumiai Chemical Industry Company, E.I. du Pont de Nemours and
 Company; viz The Pesticide Manual 10. vydání, str. 888 - 889,
 Clive Tomlin, vyd., British Crop Protection Council, 49 Downing
 Street, Farmham, Surrey G49 7PH, United Kingdom),
 a sulfonylkarboxamidy (Alvaro et al., U.S. patent č. 4883914)
 účinkují inhibicí AHAS enzymatické aktivity. (viz Cheleff et
 al., Science 224: 1443, 1984; LaRossa et al., J. Biol. Chem.
 259: 8753, 1984; Ray, Plant Physiol. 75: 827, 1984; Shaner et
 al., Plant Physiol., 76: 545, 1984). Tyto herbicidy jsou vysoce
 účinné a neškodné pro prostředí. Jejich použití je v zemědělství
 nicméně omezeno nedostatkem jejich selektivity, protože plodiny,
 stejně jako nežádoucí plevel, jsou senzitivní na fytofoxický
 účinek těchto herbicidů.

Bedbrook et al., U.S: patent č. 5013659, 5141870 a 5378824,
 popsal několik sulfonylmočovín rezistentních na AHAS varianty.
 Nicméně, tyto varianty byly získány buď mutagenizováním rostlin,
 semen nebo buněk a selekcí mutantů rezistentních na herbicidy,
 nebo byly odvozeny od takových mutantů. Tento přístup je
 nepředvídatelný v tom, že spoléhá (alespoň z počátku) na
 náhodnou šanci zavedení relevantní mutace, spíše než na
 racionální přístup ve vývoji založený na strukturálním modelu
 cílového proteinu.

Tak zde stále ještě existuje potřeba pro metody a kompozice, které poskytují selektivní širokospektrou a/nebo specifickou rezistenci na herbicidy u kultivovaných plodin. Vynálezci objevily, že variantní formy AHAS selektivně rezistentní na herbicidy a rostliny, které je obsahují, mohou být připraveny na struktuře založeným modelováním AHAS proti pyruvát oxidase (POX), identifikováním herbicid vazebných míst na AHAS modelech a projektováním specifických mutací, které mění afinitu herbicidu pro vazbu na vazebné místo. Tyto varianty a rostliny nejsou inhibovány nebo zabíjeny jednou nebo více třídami herbicidů a zachovávají dostatečnou AHAS enzymatickou aktivitu pro podporu růstu plodiny.

Popis obrázků na připojených výkresech

Obrázek 1 je ilustrací sekvence 600 aminokyselin korespondujících přibližně 599 aminokyselinové sekvenci kyselina hydroxyoctová syntetasy (AHAS) z *Zea Mays*, která je dána jako příklad AHAS enzymu. Sekvence nezahrnuje transitní sekvenci a zvláštěni glycin je pozůstatek ze štěpícího místa pro trombin. Zbytky Met53, Arg128 a Phe135 jsou uvedeny tučně.

Obrázek 2 je ilustrací sestavení sekvence kukuřičné AHAS a pyruvát oxidasy (POX) z *Lactobacillus planarum*.

Obrázek 3 je schematickou reprezentací sekundární struktury AHAS podjednotky. Rádné elementy sekundární struktury, α -šroubovice a β -listu, jsou znázorněny jako kroužky a elipsy, v příslušném pořadí, a jsou počítány separátně pro každou ze tří domén podjednotky. Regiony smyček a závitů jsou reprezentovány černou linkou, s čísly reprezentujícími přibližné začátky a

konce elementů. Umístění vazebných míst pro kofaktor a známých mutačních míst je ukázáno oktahedrony a hvězdičkami, v příslušném pořadí.

Obrázek 4 ilustruje počítačem generovaný model aktivního místa kukuřičné AHAS s imazethapyrem (PURRSUIT[®] herbicid) modelovaným do vazebného místa.

Obrázek 5 je ilustrací homologie mezi AHAS aminokyselinovou sekvencí odvozenou z různých druhů rostlin. pAC 751 je kukuřičný als 2 AHAS izoenzym jak je exprivován z pAC 751 E. coli expresního vektoru jak je uvedeno na obrázku 1; kukuřičný als 2 je kukuřičný als 2 AHAS izoenzym; kukuřičný als 1 je kukuřičný als 1 AHAS izoenzym; Tabák 1 je tabákový AHAS SurB izoenzym; Athcsr 12 je Arabinopsis thaliana Csr 1.2. AHAS gen; Bnaal 3 je Brassica napus AHAS III izoenzym; a Bnaal 2 je Brassica napus AHAS II izoenzym.

pAC 751 a kukuřičný als 2 jsou identické geny s tou výjimkou, že kukuřičný als 2 začíná v počátku transitní sekvence a pAC 751 začíná v putativním zralém N-terminálním místě a dalším glycinem na N-konci v důsledku sekvence rozpoznávající trombin v pGEX-2T expresním vektoru. N-terminální glycin není zralou aminokyselinou v této pozici.

Sestavení aminokyselinové sekvence AHAS proteinů bylo generováno PILEUP (GCG Package - Genetics Computer Group, Inc., - University Research Park - Madison-WI). Konsenzuální sekvence byla generována PRETTY GCG Package).

Obrázek 6 je fotografickou ilustrací SDS-polyakrylamidového

05.01.98

gelu barveného na proteiny ukazující purifikaci kukuřičné AHAS. Linie obsahují (zleva doprava): A, značky molekulové hmotnosti; B, surový extrakt z *E. coli*; C, glutathion agarosa afinitně purifikovaný přípravek; D: trombinové trávení afinitně purifikovaného přípravku; E: druhý běh přes glutathion-agarosovou kolonu a Sephacryl S-100 gelovou filtraci.

Obrázek 7 je grafickým znázorněním výsledků *in vitro* testů na enzymatickou aktivitu přirozených a mutantních AHAS proteinů za absence a za přítomnosti zvýšených koncentrací imazethapyru (PURRSUIT[®] herbicid). Osa Y reprezentuje % aktivity mutantního enzymu, kde 100% hodnota je měřena za absence inhibitoru.

Obrázek 8 je grafickou ilustrací výsledků *in vitro* testů na enzymatickou aktivitu přirozených a mutantních AHAS proteinů za absence a za přítomnosti zvýšených koncentrací sulfometuron methyly (OUST[®] herbicid). Osa Y reprezentuje % aktivity mutantního enzymu, kde 100% hodnota je měřena za absence inhibitoru.

Obrázek 9 je grafickou ilustrací výsledků *in vitro* testů na enzymatickou aktivitu přirozených a mutantních AHAS proteinů od *Arabidopsis* za absence a za přítomnosti zvýšených koncentrací imazethapyru (PURSUIT[®] herbicide) a sulfometuron methyly (OUST[®] herbicid). Osa Y reprezentuje % aktivity mutantního enzymu, kde 100% hodnota je měřena za absence inhibitoru.

Obrázek 10 je grafickou ilustrací výsledků *in vitro* testů na enzymatickou aktivitu přirozeného AHAS proteinu a Met124His mutantního AHAS proteinu od *Arabidopsis* za absence a za přítomnosti zvýšených koncentrací imazethapyru (PURSUIT[®]

05.01.98

herbicide) a sulfometuron methyly (OUST[®] herbicide). Osa Y representuje % aktivity mutantního enzymu, kde 100% hodnota je měřena za absence inhibitoru.

Obrázek 11 je grafickou ilustrací výsledků in vitro testů na enzymatickou aktivitu přirozeného AHAS proteinu a Arg199Glu mutantního AHAS proteinu od Arabidopsis za absence a za přítomnosti zvýšených koncentrací imazethapyru (PURSUIT[®] herbicide) a sulfometuron methyly (OUST[®] herbicide). Osa Y representuje % aktivity mutantního enzymu, kde 100% hodnota je měřena za absence inhibitoru.

Obrázek 12 je schematickou ilustrací DNA vektoru použitého pro transformaci rostlin, kde tento vektor obsahuje nptII gen (kodující rezistenci na kanamycin) pod kontrolou 35S promotoru a AHAS gen (přirozený nebo variantní) pod kontrolou Arabidopsis AHAS promotoru.

Obrázek 13 je fotografie ukazující vývoj výhonků tabakových rostlin transformovaných Arabidopsis AHAS genem obsahujícím buď Met124Ile nebo Arg199Glu mutaci a netransformovaných kontrol. Rostliny byly kultivovány po 18 dnů po přenesení do media obsahujícího 0,25 μ M imazethapyru.

Obrázek 14 je fotografie ukazující tabakové rostliny transformované Arabidopsis AHAS genem obsahujícím buď Met124Ile, Met124His nebo Arg199Glu mutaci a netransformovaných kontrol, které byly postříkovány dvakrát dávkou (100 g/ha) imazethapyru.

Obrázek 15 je fotografie ukazující výsledky germinačních testů provedených za přítomnosti herbicide CL 299,263

05.01.99

(imazamox), které byly provedeny na semenech získaných od primárních transformantů tabákových rostlin, které byly transformovány Arabidopsis AHAS genem obsahujícím jednu z Met124Ile, Met124His nebo Arg199Glu mutací.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje na struktuře založenou modelační metodu pro produkci AHAS variantních proteinů rezistentních na herbicidy. Metoda obsahuje:

- (a) sestavení cílového AHAS proteinu na pyruvát oxidasovém templátu nebo tomuto ekvivalentní AHAS modelování pro odvození trojrozměrné struktury cílového AHAS proteinu;
- (b) modelování jednoho nebo více herbicidů do trojrozměrné struktury pro lokalizaci vazebného místa pro herbicid v cílovém AHAS proteinu;
- (c) selekci alespoň jedné aminokyselinové pozice v cílovém AHAS proteinu jako cíle pro mutaci, kde mutace pozměňuje afinitu alespoň jednoho herbicidu k vazebnému místu;
- (d) mutaci DNA kodující cílový AHAS protein pro produkci mutantní DNA kodující variantní AHAS obsahující mutaci, jako je, například, alespoň jedna odlišná aminokyselina v pozici; a
- (e) expresi mutované DNA v jedné buňce, za podmínek, za kterých je produkován variantní AHAS obsahující mutaci, jako je, například, odlišná aminokyselina(y) v pozici.

05.01.99

Metoda může dále obsahovat:

(f) expresi DNA kodující přirozený AHAS protein paralelně ve druhé buňce;

(g) purifikaci přirozených a variantních AHAS proteinů z buněk;

(h) testování přirozených a variantních AHAS proteinů na katalytickou aktivitu v konversi pyruvátu na acetolaktát nebo v kondenzaci pyruvátu a 2-ketobutyrátu za tvorby acetohydroxybutyrátu, za absence a za přítomnosti herbicidu; a

(i) opakování kroků (c) - (h), kde je DNA kodující AHAS variantu v kroku (e) použita jako AHAS kodující DNA v kroku (c), dokud není identifikován první AHAS variantní protein rezistentní na herbicid, který má vlastnosti:

(i) za absence alespoň jednoho herbicidu

(a) má katalytickou aktivitu, která je sama dostatečná k tomu, aby udržela životaschopnost buněk, ve kterých je exprivován; nebo

(b) má katalytickou aktivitu v kombinaci s nějakým jiným AHAS variantním proteinem rezistentním na herbicid, který může být stejný nebo jiný než první AHAS variantní protein, která je dostatečná k tomu, aby udržela životaschopnost buněk, ve kterých je exprivován;

kde buňky vyžadují AHAS aktivitu pro přežívání; a

05.01.99

(ii) má katalytickou aktivitu, která je více rezistentní k alespoň jednomu herbicidu než přirozená AHAS.

Je také poskytnuta alternativní na struktuře založená modelační metoda pro produkci AHAS variantních proteinů rezistentních na herbicidy. Tato metoda obsahuje:

(a) sestavení cílového AHAS proteinu na prvním AHAS templátu odvozeném od polypeptidu majícím sekvenci podle obrázku 1 nebo jeho funkčního kvivalentu pro odvození trojrozměrné struktury cílového AHAS proteinu;

(b) modelování jednoho nebo více herbicidů do trojrozměrné struktury pro lokalizaci vazebného místa pro herbicid v cílovém AHAS proteinu;

(c) selekci alespoň jedné aminokyselinové pozice v cílovém AHAS proteinu jako cíle pro mutaci, kde mutace pozměňuje afinitu alespoň jednoho herbicidu k vazebnému místu;

(d) mutaci DNA kodující cílový AHAS protein pro produkci mutantní DNA kodující variantní AHAS obsahující mutaci v pozici;

(e) expresi mutované DNA v jedné buňce, za podmínek, za kterých je produkován variantní AHAS obsahující mutaci v pozici.

Tato metoda může dále obsahovat:

(f) expresi DNA kodující přirozený AHAS protein paralelně ve druhé buňce;

05.01.98

(g) purifikaci přirozených a variantních AHAS proteinů z buněk;

(h) testování přirozených a variantních AHAS proteinů na katalytickou aktivitu v konverzi pyruvátu na acetolaktát nebo v kondensaci pyruvátu a 2-ketobutyátu za tvorby acetohydroxybutyrátu, za absence a za přítomnosti herbicidu; a

(i) opakování kroků (c) - (h), kde je DNA kodující AHAS variantu v kroku (e) použita jako AHAS kodující DNA v kroku (c), dokud není identifikován první AHAS variantní protein rezistentní na herbicid, který má vlastnosti:

(i) za absence alespoň jednoho herbicidu

(a) má katalytickou aktivitu, která je sama dostatečná k tomu, aby udržela životaschopnost buněk, ve kterých je exprivován; nebo

(b) má katalytickou aktivitu v kombinaci s nějakým jiným AHAS variantním proteinem rezistentním na herbicid také exprivovaným v buňce, který může být stejný nebo jiný než první AHAS variantní protein, která je dostatečná k tomu, aby udržela životaschopnost buněk, ve kterých je exprivován;

kde buňky vyžadují AHAS aktivitu pro přežívání; a

(ii) má katalytickou aktivitu, která je více rezistentní k alespoň jednomu herbicidu než přirozená AHAS.

V jiném alternativním provedení metoda obsahuje:

05.01.98

(a) sestavení cílového AHAS proteinu na prvním AHAS templátu majícím identifikované vazebné místo pro herbicid a majícím sekvenci podle obrázku 1 nebo jeho funkčním ekvivalentu pro odvození trojrozměrné struktury cílového AHAS proteinu;

(b) selekci alespoň jedné aminokyselinové pozice v cílovém AHAS proteinu jako cíle pro mutaci, kde mutace pozměňuje afinitu alespoň jednoho herbicidu k vazebnému místu;

(c) mutaci DNA kodující cílový AHAS protein pro produkci mutantní DNA kodující variantní AHAS obsahující mutaci v pozici;
a

(d) expresi mutované DNA v jedné buňce, za podmínek, za kterých je produkován variantní AHAS obsahující mutaci v pozici.

Tato metoda může dále obsahovat:

(e) expresi DNA kodující přirozený AHAS protein paralelně ve druhé buňce;

(f) purifikaci přirozených a variantních AHAS proteinů z buněk;

(g) testování přirozených a variantních AHAS proteinů na katalytickou aktivitu v konverzi pyruvátu na acetolaktát nebo v kondensaci pyruvátu a 2-ketobutyrate za tvorby acetohydroxybutyrátu, za absence a za přítomnosti herbicidu; a

(h) opakování kroků (b) - (g), kde je DNA kodující AHAS variantu v kroku (d) použita jako AHAS kodující DNA v kroku (b),

05.01.98

dokud není identifikován první AHAS variantní protein rezistentní na herbicid, který má vlastnosti:

(i) za absence alespoň jednoho herbicidu

(a) má katalytickou aktivitu, která je sama dostatečná k tomu, aby udržela životaschopnost buněk, ve kterých je exprivován; nebo

(b) má katalytickou aktivitu v kombinaci s nějakým jiným AHAS variantním proteinem rezistentním na herbicid také exprivovaným v buňce, který může být stejný nebo jiný než první AHAS variantní protein, která je dostatečná k tomu, aby udržela životaschopnost buněk, ve kterých je exprivován;

kde buňky vyžadují AHAS aktivitu pro přežívání; a

(ii) má katalytickou aktivitu, která je více rezistentní k alespoň jednomu herbicidu než přirozená AHAS.

V preferovaném provedení výše uvedených metod je katalytická aktivita za absence herbicidu alespoň okolo 5 % a lépe více než asi 20 % katalytické aktivity přirozené AHAS. Pokud je herbicid imidazolinonový herbicid, pak AHAS variantní protein rezistentní na herbicid preferovaně má:

(i) katalytickou aktivitu za absence herbicidu vyšší než asi 20 % katalytické aktivity přirozené AHAS;

(ii) katalytickou aktivitu, které je relativně více rezistentní na přítomnost imidazolinonových herbicidů ve

srovnání s přirozenou AHAS; a

(iii) katalytickou aktivitu, která je relativně více citlivá na přítomnost sulfonylmočovinných herbicidů ve srovnání s imidazolinonovými herbicidy.

Předkládaný vynález dále poskytuje izolovanou DNA kodující variantní proteiny kyselina hydroxyoctová syntetasy (AHAS), kde variantní proteiny obsahují AHAS proteiny modifikované:

(i) substitucí alespoň jednoho různého aminokyselinového zbytku v aminokyselinovém zbytku sekvence podle obrázku 1 vybraného ze skupiny, která se skládá z 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, R267, 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, O335, T404, G413, V414, G415, Q416, H417, Q418, M419, W420, A421, A422, L434, S435, A437, G438, L439, G440, A441, M442, G443, D467, S468, 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, funkčních ekvivalentů kteréhokoliv z výše uvedených a jakékoliv kombinace kteréhokoliv z výše uvedených.

(ii) delecí více než 5 aminokyselinových zbytků předcházejících, nebo více než 5 aminokyselinových zbytků následujících alespoň jednomu aminokyselinovému zbytku



sekvence podle obrázku 1 vybraného ze skupiny, která se skládá z 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, R267, 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, O335, T404, G413, V414, G415, Q416, H417, Q418, M419, W420, A421, A422, L434, S435, A437, G438, L439, G440, A441, M442, G443, D467, S468, 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, funkčních ekvivalentů kteréhokoliv z výše uvedených a jakékoliv kombinace kteréhokoliv z výše uvedených;

(iii) delecí alespoň jednoho aminokyselinového zbytku nebo jeho funkčního ekvivalentu mezi Q124 a H150 sekvence podle obrázku 1;

(iv) adicí alespoň jednoho aminokyselinového zbytku nebo jeho funkčního ekvivalentu mezi Q124 a H150 sekvence podle obrázku 1;

(v) delecí alespoň jednoho aminokyselinového zbytku nebo jeho funkčního ekvivalentu mezi G300 a D324 sekvence podle obrázku 1;

(vi) adicí alespoň jednoho aminokyselinového zbytku nebo jeho funkčního ekvivalentu mezi G300 a D324 sekvence podle obrázku 1; nebo

(vii) jakoukoliv kombinací kteréhokoliv z výše uvedených.

05.01.98

V tomto systému počítání koresponduje zbytek č. 2 putativnímu aminokyselinovému konci zralého proteinu, t.j. po odstranění chloroplast zaměřujícího peptidu.

Výše uvedené modifikace jsou zaměřeny na změnění schopnosti herbicidu, a preferovaně imidazolinonového herbicidu, inhibovat enzymatickou aktivitu proteinu. V preferovaném provedení koduje izolovaná DNA na herbicidy rezistentní variantu AHAS. Také jsou poskytnuty DNA vektory obsahující DNA kodující tyto AHAS varianty, varianty AHAS proteinů samotné, a buňky, kultivované in vivo nebo v buněčné kultuře, které exprivují AHAS varianty nebo obsahují tyto vektory.

V jiném aspektu poskytuje předkládaný vynález metodu pro udělení rezistence na herbicidy buňkám nebo buňce a zejména rostliné buňce nebo buňkám jako jsou například semena. AHAS gen, preferovaně *Arabidopsis thaliana* AHAS gen, je mutován pro pozměnění schopnosti herbicidu inhibovat enzymatickou aktivitu AHAS. Mutantní gen je klonován do kompatibilního expresního vektoru a gen je transformován do buňky citlivé na herbicidy za podmínek, za kterých je exprivován v dostatečné hladině pro udělení rezistence na herbicidy buňce.

Také jsou poskytovány metody pro kontrolu plevelu, kde plodina obsahující AHAS gen rezistentní na herbicidy podle předkládaného vynálezu je kultivována a ošetřována plevel kontrolujícím účinným množstvím herbicidu.

Také je popsána na struktuře založená modelační metoda pro přípravu prvního herbicidu, který inhibuje AHAS aktivitu. Metoda obsahuje:

05.01.98

(a) sestavení cílového AHAS proteinu na pyruvát oxidasový templát nebo AHAS modelování jeho funkčního ekvivalentu pro odvození trojrozměrné struktury cílového AHAS proteinu;

(b) modelování druhého herbicidu majícího AHAS inhibiční aktivitu do trojrozměrné struktury pro odvození umístění, struktury vazebného místa pro herbicid nebo jejich kombinace v cílovém AHAS proteinu; a

(c) vývoj non-peptidového prvního herbicidu, který bude interagovat s, a preferovaně se bude vázat na, AHAS aktivitu inhibující účinnou část vazebného místa, kde první herbicid inhibuje AHAS aktivitu dostatečně pro porušení životaschopnosti buněk, které vyžadují AHAS aktivitu pro svou životaschopnost.

Alternativní na struktuře založená modelační metoda pro přípravu prvního herbicidu, který inhibuje AHAS aktivitu, je také popsána. Metoda obsahuje:

(a) sestavení cílového AHAS proteinu na první AHAS templát odvozený od polypeptidu majícího sekvenci podle obrázku 1 nebo jeho funkčního ekvivalentu, pro odvození trojrozměrné struktury cílového AHAS proteinu;

(b) modelování druhého herbicidu majícího AHAS inhibiční aktivitu do trojrozměrné struktury pro odvození umístění, struktury vazebného místa pro herbicid nebo jejich kombinace v cílovém AHAS proteinu; a

(c) vývoj non-peptidového prvního herbicidu, který bude interagovat s, a preferovaně se bude vázat na, AHAS aktivitu

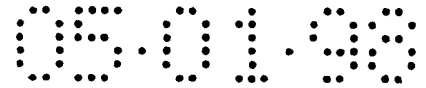
inhibující účinnou část vazebného místa, kde první herbicid inhibuje AHAS aktivitu dostatečně pro porušení životaschopnosti buněk, které vyžadují AHAS aktivitu pro svou životaschopnost.

Preferovaně v každé metodě obsahuje první herbicid alespoň jednu funkční skupinu, která interaguje s funkční skupinou vazebného místa.

Předkládaný vynález zahrnuje racionální vývoj nebo na struktuře založené modelování modifikovaných verzí enzymu AHAS a AHAS inhibujících herbicidů. Tyto modifikované enzymy (AHAS variantní proteiny) jsou rezistentní na účinek herbicidů. Předkládaný vynález také zahrnuje DNA, které kodují tyto varianty, vektory, které obsahují tyto DNA, AHAS variantní proteiny a buňky, které exprivují tyto varianty. Dále jsou poskytnuty metody pro produkci rezistence na herbicidy u rostlin exprivováním těchto variant a metody pro kontrolu plevelu. DNA a AHAS varianty podle předkládaného vynálezu byly objeveny ve studiích, které byly založeny na molekulárním modelování struktury AHAS.

Racionální na struktuře založený vývoj AHAS variant a AHAS inhibujících herbicidů

Na herbicidy rezistentní varianty AHAS podle předkládaného vynálezu jsou použitelné v udílení rezistence na herbicidy rostlinám, a mohou být projektovány s POX modelem, AHAS modelem nebo jejich funkčními ekvivalenty, jako jsou například transketolasy, karboligasy, pyruvát dekarboxylasy, proteiny, které váží FAD a/nebo TPP jako kofaktor, nebo jakékoliv proteiny, které mají strukturální vlastnosti podobné k POX



aúnebo AHAS; s AHAS modelem jako je model mající sekvenci podle obrázku 1; nebo s funkčním ekvivaletem sekvence podle obrázku 1 včetně varianty modelované z předchozího modelu. Proteiny, které mohou být použity, obsahují jakékoliv proteiny mající méně než kořenovou průměrnou čtvercovou odchylku menší než 3,5 angstromů ve svých Ca uhlicích ve vztahu k jakékoliv z výše uvedených molekul. Na AHAS zaměřené herbicidy mohou být podobně modelovány z těchto templátů. Funkční ekvivalent AHAS aminokyselinové sekvence je sekvence mající významnou, t.j. 60 - 70% homologii, zejména v konzervovaných regionech jako je, například, putativní vazebné místo. Stupeň homologie může být určen jednoduchým sestavením bazí na programu známém v oboru, jako je, například, GAP a PILEUP s GCG. Homologie znamená identické aminokyseliny nebo konzervativní substituce. Funkční ekvivalent určitého aminokyselinového zbytku v AHAS proteinu podle obrázku 1 je aminokyselinový zbytek jiného AHAS proteinu, který, když je seřazen se sekvencí podle obrázku 1 programem v oboru známým, jako je například GAP a PILEUP s GCG, je ve stejné pozici jako aminokyselinový zbytek podle obrázku 1.

Kroky racionálního vývoje typicky obsahují: (1) sestavení cílového AHAS proteinu s POX pozadím nebo strukturou nebo s AHAS pozadím nebo strukturou; (2) volitelně, a pokud má AHAS pozadí identifikované vazebné místo pro herbicid, modelování jednoho nebo více herbicidů do trojrozměrné struktury pro lokalizaci vazebného místa pro herbicid do cílového proteinu; (3) selekci mutace na základě modelu; (4) místně řízenou mutagenesi; a (5) expresi a purifikaci variant. Další kroky mohou zahrnovat (6) testování enzymatických vlastností a (7) hodnocení vhodných variant srovnáním s vlastnostmi přirozeného typu AHAS. Každý krok je diskutován odděleně dále.

1. Molekulární modelování

Techniky molekulárního modelování (a zejména modelování proteinové homologie) mohou dát pochopení struktury a aktivity daného proteinu. Strukturální model proteinu může být určen přímo z pokusných dat jako je rentgenová krystalografie, nepřímo pomocí modelování homologie a podobně, nebo kombinací těchto metod (viz White et al., Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 23, 349, 1994). Výklad trojrozměrné struktury AHAS poskytuje základ pro vývoj racionálního schematu pro mutaci určitého aminokyselinového zbytku v AHAS, která udělí polypeptidu rezistenci na herbicid.

Molekulární modelování struktury Zea Mays AHAS, za použití templátu známé rentgenové krystalové struktury příbuzné pyruvát oxidasy (POX) od *Lactobacillus plantarum*, poskytuje trojrozměrný model AHAS struktury, který je použitelný pro vývoj AHAS variant rezistentních na herbicidy nebo AHAS inhibujících herbicidů. Tento modelační postup má výhodu toho, že AHAS a POX sdílí mnoho biochemických charakteristik a mohou být odvozeny od společného genu (Chang et al., J. Bacteriol. 170: 3937, 1988).

Vzhledem k vysokému stupni mezidruhové homologie v AHAS mohou být modelované AHAS zde popsané nebo jejich funkční ekvivalenty použity jako templáty pro vývoj AHAS variantních proteinů.

Odvození jednoho modelu za použití interaktivní molekulární grafiky a seskupení je podrobně popsáno dále. Trojrozměrná AHAS struktura, která vznikla z tohoto postupu, určuje přibližnou prostorovou orientaci aktivního místa enzymu a vazebného místa nebo kapsy inhibitoru jako je herbicid včetně, ale nejenom,

imidazolinonových herbicidů. Model je potom upraven a reinterpretován na základě biochemických studií, které jsou také popsány dále.

Modelování proteinové homologie vyžaduje sestavení primární sekvence studovaného proteinu s druhým proteinem, jehož krystalová struktura je známa. Pyruvát oxidasa (POX) byla vybrána pro modelování AHAS homologie, protože POX a AHAS sdílejí mnoho biochemických charakteristik. Například, jak POX, tak AHAS mají stejné aspekty enzymového reakčního mechanismu, stejně jako kofaktoru a potřeby kovů. V obou enzymech jsou pro enzymatickou aktivitu požadovány thiamin pyrofosfát (TPP), flavin adenin dinukleotid (FAD) a divalentní kationt. FAD zprostředkuje redukční reakci během katalýzy v POX, ale předpokládáně má pouze strukturální funkci v AHAS, což je možná pozůstatek z evoluce AHAS z POX. Oba enzymy využívají pyruvát jako substrát a tvoří hydroxyethyl thiamin pyrofosfát jako stabilní intermediát reakce (Schloss, J.V. et al., v Biosynthesis of branched chain amino acids, Barak, Z.J.M., Chipman, D.M., Schloss, J.V. (eds) VCH Publishers, Weinheim, Germany, 1990).

Dále, AHAS aktivita je přítomna v chimerických POX-AHAS proteinech skládajících se z N-terminální poloviny POX a C-terminální poloviny AHAS a je zde malý stupeň AHAS aktivity vykazovaný POX samotnou. AHAS a POX také vykazují podobné vlastnosti v roztoku (Risse, B. et al., Protein Sci. 1: 1699 a 1710, 1992; Singh, B.K., a Schmitt, G.K. (1989), FEBS Letters, 258: 113; Singh, B.K. et al., (1989) v: Prospects for Amino Acid Biosynthesis Inhibitors in Crop Protection and Pharmaceutical Chemistry, (Lopping, L.G., et al., vyd., BCP Monograph str. 87).

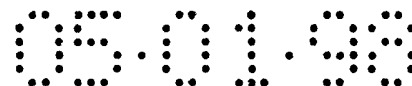
05.01.98

Se zvýšenou koncentrací proteinu podléhají jak POX, tak AHAS postupné přeměně z monomerů na dimery a tetramery. Zvýšení v koncentraci FAD také indukuje vyšší řády sestavení podjednotek. V tetramerické formě jsou oba proteiny nejvíce stabilní k teplu a chemické denaturaci.

Dále, krystalová struktura POX z *Lactobacillus planarum* byla popsána Mullerem et al., *Science* 259: 965, 1993. Vynálezci tohoto vynálezu zjistili, že na základě stupně fyzikální, biochemické a genetické homologie mezi AHAS a POX může být rentgenová krystalická POX použita jako strukturální počáteční bod pro modelování homologie AHAS struktury.

Nicméně, AHAS a *L. planarum* POX sekvence nejsou dostatečně podobné pro úplné počítačové sestavení. Celkem je pouze asi 20% aminokyselin identických, zatímco asi 50% reziduí je stejné třídy (t.j. acidické, bázičké, aromatické, a podobně). Nicméně, pokud je sekvence srovnána s ohledem na klasifikace hydrofobních a hydrofilních zbytků, potom odpovídá 500 ze 600 aminokyselin. Určení sekundární struktury pro AHAS (Holley et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 86: 152, 1989) ukázalo silnou podobnost k aktuální sekundární struktuře POX. Pro téměř 70% zbytků odpovídá předpokládaná sekundární struktura struktuře POX.

POX monomery se skládají ze tří domén, kde všechny mají centrální, paralelní β -list se zkřížením skládajícím se z α -šroubovic a dlouhých smyček. (Muller et al., *Science* 259: 965, 1993). Topologie listů se liší mezi doménami, t.j. v první a ve třetí doméně jsou řetězce sestaveny do β -listu v sekvenci 2-1-3-4-6-5, zatímco v β -listu druhé domény se sekvence čte 3-2-1-4-5-6.



Počítačově generované sestavení bylo založeno na určení sekundární struktury a na homologii sekvence. Byla použita běžná metoda párového sestavení sekvence, kterou popsal Needleman and Wunch, J. Mol. Biol., 48: 443, 1970. Dvě sekvence byly seřazeny pro maximalizaci skóre seřazení. Skóre seřazení (skóre homologie) je sumou skóre pro všechny páry seřazených zbytků, plus volitelných pokut za vložení mezer do seřazení. Skóre pro seřazení párů zbytků je tabelovaná číselná hodnota. System skorování homologie je založen na pozorování frekvence divergence mezi danými páry zbytků. (MO Dayhoff, RM Schwartz and BC Orcutt "Atlas of Protein Sequence and Structure", sv. 5. suppl. 3 str. 345 - 362, 1978).

Seřazení bylo dále vylepšeno přemístěním mezer tak, aby se konzervovaly kontinuální řádné sekundární struktury. Aminokyselinové substituce generované hodnocením pravděpodobných schémat seřazení byly srovnávány prostředky interaktivní molekulární grafiky. Bylo vybráno seřazení s nejvíce konzervativními substitucemi s ohledem na určitou funkčnost aminokyselin v daném místě. Konečné seřazení POX a AHAS je ukázáno na obrázku 2. Byla identifikována konzervativní seskupení zbytků, zejména pro TPP vazebné místo a pro části FAD vazebného místa. Seřazení odhalilo vysoký stupeň podobnosti mezi AHAS a POX pro první doménu, pro většinu částí druhé domény a pro asi polovinu třetí domény. Většina regionů, které byly špatně seřazeny a mohly se různě skládat v POX a AHAS byla očekávána na povrchu proteinu a nebyly zahrnuty ve vazbě kofaktoru nebo inhibiční vazbě. Určení mutačních míst není významně ovlivněno malými posuny v seřazení.

Většina TPP vazebných zbytků je vysoce konzervována v POX a

05.01.98

AHAS (např. P48 - G49 - G50). V některých případech se zbytky těsné k TPP liší mezi POX a AHAS, ale zůstávají v regionu, který je vysoce konzervován (například, zbytky 90 - 110). Na druhou stranu, FAD vazebné místo se zdá být méně konzervované. Ačkoliv byly některá FAD vazebná místa vysoce konzervována (například D325-I326-D327-P328), jiná se jasně lišila mezi POX a AHAS (například zbytky ve smyčce v pozici 278 - 285 nejsou homologní). Podrobná analýza ukázala, že, alespoň pro některá z méně konzervovaných kontaktních míst, byly interakce zprostředkovány spíše polypeptidovou kostrou než postranními řetězci. Proto, konzervace byla vyžadována pouze pro složení polypeptidu a nikoliv pro aminokyselinovou sekvenci (například kostra ze zbytků 258 - 263 se váže na ribitol řetězec FAD). Polovina vazebných míst pro adenin a izoalloxazin se jasně liší.

Po sestavení primární struktury byl postaven model homologie transpozicí AHAS aminokyselinové sekvence na POX templátovou strukturu. Chybějící koordináty byly vytvořeny postupně za použití templátů aminokyselinových zbytků pro kompletování nedefinovaných postranních řetězců. Prohledávání data bank a minimalizace energie malých částí molekuly byly použity pro kompletování konformace nedefinovaných smyčkových regionů. Kofaktory TPP a FAD byly modelovány do jejich vazebných míst. tento model byl potom podroben kompletní, 500 cyklové minimalizaci energie. Veškeré počítačové modelování bylo provedeno na IRIS Indigo Elan R4000 Workstation od Silicon Graphics Co. Interaktivní molekulové modelování a minimalizace energie byly provedeny za použití Quanta/CHARMm 4.0 od Molecular Simulations Inc. Během tohoto kroku byla konformace stabilní, což ukazuje, že žádné silné nežádoucí interakce, jako jsou



například těsné van der Waalsovi kontakty, se nevyskytly. Výsledky jsou schematicky ukázány na obrázku 3.

Charakteristiky předpokládané AHAS struktury

Prohlídka modelované AHAS struktury popsané výše ukázala, že většina proteinu se skládá s kostrou, které je energeticky přiměřená, s většinou hydrofilních postraních řetězců přístupných rozpouštědlu. Povrchy β -listů jsou hladké a mají na sobě místo pro překřížené regiony, které jsou na ně připojeny.

Model pro dimerické AHAS byl generován duplikováním koordinátů energeticky minimalizovaných monemerických AHAS supervložením dvou kopií na dvě POX podjednotky za použití párů $C\alpha$ koordinátů jak je definováno ve schématu sestavení. Polypeptidový řetězec AHAS se skládá do tří podobně složených domén složených z šestiřetězcového paralelního β -listu jádra obklopeného dlouhými "smyčkami" a α -šroubovicemi. Dvě podjednotky jsou seřazeny tak, že první doména jedné podjednotky je v těsné blízkosti kofaktorových vazebných domén 2 a 3 jiné podjednotky. Rozpouštědlem vyplněný prostor zůstává mezi podjednotkami v tomto místě. Tato kapsa, která je definována vlivem tří domén, je předpokládaným vstupním místem pro substrát. Je také předpokládáno, že to je vazebné místo pro herbicidy.

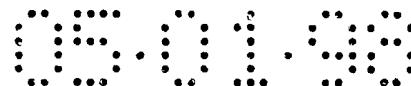
Vnitřní povrch vazebné kapsy je nastíněn kofaktory. Thiazol TPP je umístěn na dně kapsy. Doména 3 dává vnitřnímu povrchu kapsy krátkou α -šroubovici, která umísťuje svou osu směrem k pyrofosfátu na TPP, což kompenzuje fosfátový náboj svým dipolárním momentem. Tato kritická šroubovice, která začíná

G498, "otočkovým" zbytkem v těsném kontaktu s TPP, a která končí v F507, obsahuje tři známá mutační místa pro rezistenci na sulfonylureu: V500, W503 a F507 (viz U.S.Patenty č. 5.013.659; 5.141.870; a 5.378.824). V doméně 1 je zmyčka definována jako P48 - S52 (mezi β -řetězcem 2 a α -šroubovicí 2) je W503, mutace, ve které vzniká rezistence na imidazolinony. Zbytky Y47 až G50 jsou také v kontaktu s TPP. Tato smyčka je sousedící s P184 - Q189, jinak otočené, která spojuje poslední řetězec β -listu domény 1 s β -řetězcem, který spojuje s doménou 2. Uvnitř kapsy, poblíž jejího vchodu, je dlouhý region domény 1, který interaguje s komplementárním řetězcem domény 2. Residua 125 - 129 a 133 - 137 domény 1 a residua 304 - 313 domény 2 jsou na povrchu kapsy. Záhyb skládající se z T96 - G100 je mezi smyčkou 125 - 129 a TPP. Další řetězec domény 3 a dva regiony domény 2, které ohraničují vazebnou kapsu, jsou na opačném rohu kapsy. Zbytky 572, 575, 582 a 583 domény 3 definují povrch kapsy na jedné straně. Zbývající část vnitřního povrchu kapsy je definována FAD a smyčkou L278 - G282, která kontaktuje izoalloxazinový kruh FAD.

Strukturální modely AHAS proteinu mohou být také použity pro racionální vývoj herbicidů nebo AHAS inhibitorů.

2. Modelování herbicidů do vazebných míst

Imazethapyr, aktivní imidazolinon v PURSUIT[®] byl umístěn do svého předpokládaného vazebného místa za použití intraktivní molekulární grafiky (obr. 4) a softwaru popsáno výše (obr.4). K185 byl vybrán jako "kotva" pro interakci s nábojem karboxylové skupiny NH-CO jednotka imidazolinonu byla umístěna pro tvorbu vodíkových můstků na G50 a A51. Toto umístilo methylový



substituent imazethapyru těsně k V500 kostry malé α -šroubovice. Tato isopropylová skupina je pravděpodobně vázána hydrofobními zbytky aminokyselin v regionu zbytků 125 - 135, které vytvářejí vnitřní povrch kapsy. Pyridinový kruh je nejpravděpodobněji "sandwichován" mezi A134 nebo F135, F507 a W503. W503 také interaguje se systémem imidazolinonového kruhu.

Podobným způsobem byly modelovány sulfonylmočovinné herbicidy do místa, které částečně přesahuje popsané vazebné místo pro imidazolinon. Překrytí sulfonylmočovinných a imidazolinonových vazebných míst byl v souladu s pokusy kompetiční vazby a se stanovenými mutantními daty, která ukazují, že stejná mutace u kukuřice, W503L, může vytvářet rezistenci na oba herbicidy. V těchto modelech je většina známých mutačních míst, která udílí rezistenci na sulfonylmočovinné herbicidy, t.j. G50, A51, K185, V500, W503, F507, v těsném kontaktu s navázanými herbicidy. P126 a A51 jsou vyžadovány pro udržení K185 postranního řetězce v místě generováním hydrofobního póru. S582, místo pro specifickou imidazolinonovou rezistenci, je dále od vazebného regionu a je umístěno v regionu, kde je homologie tak slabá, že je očekávána změna ve složení. FAD vazebné místo má zjevně nízkou homologii mezi AHAS a POX v tomto regionu; S582 je zbytek, který udílí rezistenci u kukuřice a tento S582 a s ním sousedící zbytky jsou v těsném kontaktu s aktivním místem kapsy. Je předpokládáno, že FAD a region smyčky obsahující zbytky 278 až 285 je posunut mírně od třetí domény, (dole na obrázku 4) a že smyčka, která obsahuje S582 se skládá do prostoru mezi šroubovicí v pozici 499 až 507 a smyčkou v pozicích 278 až 285. D305, jiné známé místo mutace, je těsně u FAD a moduluje interakce mezi doménami 1 a 2. M280 může být buď obsažen v umístění šroubovice do pozice

05.01.98

498 až 507, nebo přímo v inhibiční vazbě. M280 a D305 mohou být také přímo obsaženy v inhibiční vazbě, pokud se domény 1 a 2 posunou o něco blíže k sobě.

3. Selekcce mutací

Specifické aminokyselinové zbytky jsou zjištěny jako místa pro zavedení mutací do primární sekvence AHAS. Tyto aminokyseliny jsou vybrány na základě jejich umístění tak, že pokud je pozice aminokyselinového zbytku modifikována, pak bude výsledkem alterace (t.j. snížení) v afinitě herbicidu pro vazebné místo. Není nutné, aby pozice mutace byla ve vazebném místě, protože aminokyselinové zbytky mimo kapsu mohou samy o sobě alterovat náboj nebo konfiguraci vazebného místa. Selekcce cílových míst pro mutace je dosažena za použití molekulárních modelů jak jsou popsány výše. Například podle modelu uvedeného výše, arginin v pozici 128 (označený jako R128 na obrázku 1 za použití jednopísmenného kodu pro aminokyseliny) je umístěn poblíž vchodu do vazebného místa pro substrát a herbicid a má velký stupeň konformační volnosti, který dovoluje, aby se účastnil transportu nabitých herbicidů do vazebného místa. Proto je tento zbytek substituován alaninem pro odstranění jak jeho náboje, tak jeho dlouhého hydrofobního řetězce (vzniklá mutace je označena R128A).

Mutace mohou obsahovat jednoduché substituce, které nahrazují přirozenou sekvenci jakoukoliv jinou aminokyselinou. Alternativně mohou mutace obsahovat delece nebo adice jedné nebo více aminokyselin, preferovaně více než 5, v daném místě. Přidané sekvence mohou obsahovat aminokyselinovou sekvenci, o které je známo, že existuje v jiném proteinu, nebo mohou

05.01.98

obsahovat zcela syntetickou sekvenci. Dále, více než jedna mutace a/nebo více než jeden typ mutace mohou být zavedeny do jednoho polypeptidu.

4. Místně řízená mutagenese

DNA kodující AHAS může být manipulována tak, aby byly zavedeny požadované mutace. Mutagenese je provedena za použití metod, které jsou standartní v oboru, jak je popsáno, například, v Higuchi, R., Rekombinant PCR, v M.A. Innis, et al., vyd., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, str. 177 - 183, 1990.

5. Exprese a purifikace variant

Mutovaná a variantní AHAS sekvence je klonována do DNA expresního vektoru (viz např. příklad 3) a je exprivována ve vhodné buňce, jako je například E. coli. Preferovaně je DNA kodující AHAS navázána na transkripční regulační element a variantní AHAS je exprivována jako část fúzního proteinu, například, glutathion-S-transferasy, pro usnadnění purifikace (viz příklad 3, dále). Variantní AHAS je potom purifikována za použití afinitní chromatografie nebo jakékoliv jiné vhodné metody v oboru známé. "Purifikace" AHAS polypeptidu označuje izolaci AHAS polypeptidu ve formě, která umožňuje měření jeho enzymatické aktivity bez interference s jinými složkami buňky, ve které je polypeptid exprivován.

6. Testování enzymatických vlastností

Purifikované varianty AHAS mohou být testovány na jednu nebo

05.01.98

více následujících vlastností:

a) specifickou nebo katalytickou aktivitu pro konverzi pyruvátu na acetolaktát (vyjádřenou jako jednotky/mg čisté AHAS, kde jednotka aktivity je definována jako 1 μ mol acetolaktátu produkováný/hodinu), nebo na kondenzaci pyruvátu a 2-ketobutyrátu za tvorby acetohydroxybutyrátu (vyjádřenou jako jednotky/mg čisté AHAS, kde jednotka aktivity je definována jako 1 μ mol acetohydroxybutyrátu produkováný/hodinu);

b) úroveň inhibice herbicidu, jako je například, imidazolinon (vyjádřenou jako IC_{50} , koncentrací, při které je 50 % aktivity enzymu inhibováno); a

c) selektivitu rezistence na vybraný herbicid vs. jiné herbicidy. Index selektivity je definována jako násobek rezistence mutantu k imidazolinonům ve vztahu k přirozenému enzymu, dělený násobkem rezistence stejného mutantu k jinému herbicidu také ve vztahu k přirozenému typu). Násobek rezistence k herbicidu ve vztahu k přirozenému typu enzymu je vyjádřen jako IC_{50} varianty dělený IC_{50} přirozeného typu. Index selektivity je tak reprezentován následující rovnicí:

$$S.I. = \frac{IC_{50} \text{ varianty pro herb.A}/IC_{50} \text{ přirozeného typu pro herb. A}}{IC_{50} \text{ varianty pro herb.B}/IC_{50} \text{ přirozeného typu pro herb. B}}$$

Vhodné testovací systémy pro tato určení zahrnují, ale nejsou omezeny na, ty, které jsou popsány v příkladu 4, dále.

05.01.98

7.a. Hodnocení vhodných variant

Enzymatické vlastnosti variant AHAS polypeptidů jsou srovnávány s přirozeným typem AHAS. Preferovaně, dané mutace vedoucí k AHAS variantnímu polypeptidu, který si zachovává in vitro enzymatickou aktivitu k pyruvátu a nebo pyruvátu a 2-ketobutyrátu, t.j. konverzi pyruvátu na acetolaktát nebo kondenzaci pyruvátu a 2-ketobutyrátu za tvorby acetohydroxybutyrátu, (a tak se očekává jeho biologická aktivita in vivo), zatímco vykazuje katalytickou aktivitu, která je o něco více rezistentní k vybranému herbicidu, než je aktivita přirozeného typu AHAS. Preferovaně variantní AHAS vykazuje:

(i) za absence alespoň jednoho herbicidu

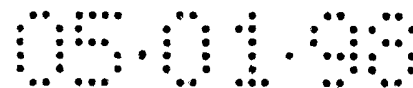
(a) katalytickou aktivitu, která je sama dostatečná k tomu, aby udržela životaschopnost buněk, ve kterých je exprivován; nebo

(b) katalytickou aktivitu v kombinaci s nějakým jiným AHAS variantním proteinem rezistentním na herbicid, který může být stejný nebo jiný než první AHAS variantní protein, která je dostatečná k tomu, aby udržela životaschopnost buněk, ve kterých je exprivován;

kde buňky vyžadují AHAS aktivitu pro přežívání; a

(ii) katalytickou aktivitu, která je více rezistentní k alespoň jednomu herbicidu než přirozená AHAS;

a která je relativně více rezistentní k herbicidu než je



přirozená AHAS.

Proto, jakýkoliv specifický AHAS variantní protein nemusí nezbytně mít úplnou katalytickou aktivitu pro udržení životaschopnosti buněk, ale musí mít nějakou katalytickou aktivitu, samostatnou nebo v kombinaci s katalytickou aktivitou dalších kopií stejné AHAS varianty a/nebo v kombinaci s katalytickou aktivitou jiných AHAS variantních proteinů, v množství dostatečném pro udržení životaschopnosti buněk, které vyžadují AHAS aktivitu pro životaschopnost. Například, katalytická aktivita může být zvýšena na minimální akceptovatelné hladiny zavedením mnoha kopií varianty kodujících genů do buňky nebo zavedením genu, který dále obsahuje relativně silný promotor pro zvýšení produkce varianty.

Více rezistentní znamená, že katalytická aktivita varianty je zmenšena herbicidy, pokud vůbec, o menší stupeň než je herbicidem zmenšena katalytická aktivita přirozeného typu AHAS. Preferované více rezistentní varianty AHAS si uchovávají dostatečnou katalytickou aktivitu pro udržení životaschopnosti buněk, rostlin nebo organismů tam, kde si při stejné koncentraci herbicidu přirozený typ AHAS nezachovává dostatečnou katalytickou aktivitu pro udržení životaschopnosti buněk, rostlin nebo organismů.

Preferovaně je katalytická aktivita za absence herbicidů alespoň okolo 5 %, a lépe je více než 20 % vzhledem ke katalytické aktivitě přirozeného typu AHAS za absence herbicidů. Nejvíce preferované AHAS varianty jsou více rezistentní k imidazolinonovým herbicidům než k jiným herbicidům jako jsou herbicidy založené na sulfonylmočovíně, s tím, že v některých

05.01.99

aplikacích není selektivita ani potřebná, ani preferovaná.

U imidazolinon rezistentních variant AHAS je preferováno, aby AHAS variantní protein měl:

(i) katalytickou aktivitu za absence uvedeného herbicidu vyšší než asi 20% katalytické aktivity uvedené přirozené AHAS;

(ii) katalytickou aktivitu, které je relativně více rezistentní na přítomnost imidazolinonových herbicidů ve srovnání s přirozenou AHAS; a

(iii) katalytickou aktivitu, která je relativně více citlivá na přítomnost sulfonylmočovinných herbicidů ve srovnání s imidazolinonovými herbicidy. Nejvíce preferované herbicid-rezistentní AHAS varianty vykazují minimální specifickou aktivitu okolo 20 jednotek/mg, minimální nebo žádnou inhibici imidazolinonem a index selektivity od asi 1,3 do asi 3000 ve vztahu k jiným herbicidům.

Bez vazby na teorii se soudí, že systematické a interaktivní aplikace této metody na přirozený typ nebo na jiný cílový AHAS protein budou vést k produkci AHAS variant majících požadované vlastnosti vysoké enzymatické aktivity jak byla popsána výše a rezistence na jednu nebo na více tříd herbicidů. Například, mutace přirozené AHAS sekvence v určité pozici na danou aminokyselinu mohou vést k mutantu, který vykazuje vysoký stupeň rezistence na herbicidy, ale signifikantní ztrátu enzymatické aktivity k pyruvátu nebo pyruvátu a 2-ketobutyrátu. Ve druhé aplikaci výše uvedené metody bude potom počáteční nebo cílový AHAS polypeptid touto variantou (místo přirozeného typu AHAS).

Racionální vývoj potom obsahuje substituování jiných aminokyselin v původně mutovaných pozicích a/nebo přidání nebo deletování aminokyselin ve vybraných místech nebo rozsazích s očekáváním zachování rezistence na herbicidy, ale také se zachováním vyšší hladiny enzymatické aktivity.

Na struktuře založený racionální vývoj na herbicidy rezistentních AHAS proteinů nabízí mnoho výhod proti konvenčním přístupům, které spočívají v náhodné mutagenesy a selekci. Například, pokud substituce určité aminokyseliny za jinou vyžaduje substituci více než jednoho nukleotidu v kodonu, pak je pravděpodobnost, že se toto vyskytne náhodně tak nízká, že není prakticky použitelná. Oproti tomu, dvojitě i trojitě změny v nukleotidové sekvenci v kodonu mohou být snadno provedeny, pokud jsou naznačeny přístupem racionálního vývoje. Například, jedna racionálně vyvinutá mutace pro udělení selektivní rezistence na imidazolinon vyžaduje změnu z argininu na glutamát. Arginin je kodovaný CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG, zatímco glutamát je kodovaný GAA a GAG. Protože žádný z kodonů pro arginin nezačíná GA, bude tato mutace vyžadovat dvojitou substituci sousedních nukleotidů, která se při náhodné mutagenesi vyskytuje tak vzácně, že je to nepředvídatelné a neopakovatelné s jakoukoliv jistotou úspěchu. Ačkoliv mutační frekvence může být zvýšena během náhodné mutagenese, alterace nukleotidové sekvence budou mít stejnou pravděpodobnost výskytu v celém AHAS genu, za absence předchozího zaměření mutací. Toto zvyšuje šanci na získání irelevantních mutací, které interferují s enzymatickou aktivitou. Obdobně, bude vzácné, za použití náhodné mutagenese, najít mnohotné aminokyselinové substituce, delece, nebo mutace substituce/delece, které dávají rezistenci na herbicidy a zároveň udržují katalytickou aktivitu. Deleční mutace, které

udílejí rezistenci na herbicidy, jsou také nepravděpodobné za použití přístupu náhodné mutagenese. Delece by měly být omezeny na malý region a měly by se vyskytovat v tripletech tak, aby se zachoval AHAS čtecí rámeček pro zachování enzymatické aktivity.

Nicméně, při použití racionální na struktuře založeného přístupu jsou dvojitě aminokyselinové substituce a/nebo deleční mutace relativně snadno dosažitelné a přesně zaměřené. Dále, různé mutageny použité v náhodné mutagenesy vytvářejí specifické typy mutací. Například, azid sodný vytváří bodové substituční mutace u rostlin, zatímco radiace vytváří spíše delece. V souladu s tím by musely být použity dva protokoly mutagenese pro získání mnohotné kombinace substitucí/delecí.

Konečně, předkládaná na struktuře založená metoda pro racionální vývoj na herbicidy rezistentních AHAS umožňuje opakovaná vylepšení mutací rezistence na herbicidy, kterýžto krok není usnadněn náhodnou mutagenézí. Identifikace mutačního místa pro rezistenci na herbicidy náhodnou mutagenézí může dát malou, pokud nějakou, prediktivní hodnotu pro zlepšení charakteristik mutantu. Předkládaný na struktuře založený přístup, na druhé straně, umožňuje určení vylepšení na základě pozice, prostředí a funkce aminokyselinové pozice ve strukturálním modelu.

Metoda opakovaného vylepšení také umožňuje nezávislou manipulaci se třemi důležitými vlastnostmi AHAS: úrovní rezistence, selektivitou rezistence a katalytickou účinností. Například mohou být vyvinuty kompenzatorní mutace prediktivním způsobem. Pokud má určitá mutace škodlivý účinek na aktivitu enzymu, pak může být druhá kompenzatorní mutace použita

05.01.99

pro znovuoobnovení aktivity. Například, změna v náboji uvnitř domény, když je zbytek s nábojem vložen nebo ztracen díky mutaci může být kompenzována zavedením druhé mutace. Předpovězení pozice a typu zbytku pro zavedení, deletování nebo substituci ve druhém místě pro nahrazení enzymatické aktivity vyžaduje znalost strukturálně-funkčních vztahů odvozených z modelu jako je ten, který je zde popsán.

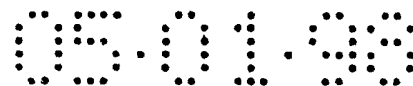
7.b. Vývoj nepeptidových herbicidů nebo AHAS inhibitorů

Chemická entita, která alteruje a může být vhodná do aktivního místa cílového proteinu nebo se váže na jakoukoliv pozici, kde může inhibovat aktivitu, může být vyvinuta metodami v oboru známými, jako je například, počítačový vývojový program, který se uplatňuje ve vývoji sloučenin, které specificky interagují s receptorovým místem.

Příkladem takového programu je LUDI (Biosym Technologies - San Diego, CA) (viz také Lam et al., Science 263: 380, 1994; Thompson et al., J. Med. Chem., 37: 3100, 1994).

Vazebná kapsa, a zejména ty zbytky, u kterých bylo identifikováno, že jsou zahrnuty v inhibiční vazbě, mohou být použity jako kotevní body pro vývoj inhibitoru.

Vývoj místně specifických herbicidů je výhodný při kontrole druhů plevelu, u kterých se může spontánně vyvinout rezistence na herbicidy v této oblasti, zejména díky mutacím AHAS genu.



Na herbicidy rezistentní AHAS varianty: DNA, vektory a polypeptidy

Předkládaný vynález také obsahuje izolované DNA molekuly kodující varianty AHAS polypeptidů rezistentních na herbicidy. Geny kodující AHAS polypeptidy podle předkládaného vynálezu mohou být odvozeny od jakéhokoliv druhu, a preferovaně od rostlinných druhů, a mutace udílející rezistenci na herbicidy mohou být zavedeny do ekvivalentních pozic v jakémkoliv z těchto AHAS genů. Ekvivalence pozic daných kodonů v různých AHAS genech je funkcí konzervace primární aminokyselinové sekvence a jeho proteinu a retence podobné trojrozměrné struktury. Například, obrázek 5 ilustruje vysoký stupeň sekvenční homologie mezi AHAS polypeptidy odvozenými od různých rostlinných druhů. Tyto AHAS polypeptidy vykazují alespoň 60 - 70% celkovou homologii. Bez vazby na teorii se soudí, že v regionech polypeptidu majících vysoce konzervovanou sekvenci bude také zachována konformace polypeptidového řetězce. Tak je možné použít AHAS-kodující sekvenci od jednoho druhu pro molekulární modelování, pro předem určené zavedení mutací do AHAS genu od druhého druhu pro iniciační testování a opakovaná vylepšení, a konečně, zavedení optimalizovaných mutací do AHAS odvozených od ještě třetích rostlinných druhů pro expresi v transgenních rostlinách.

V jedné serii provedení kodují tyto AHAS DNA varianty AHAS polypeptidu a preferovaně AHAS polypeptidu z kukuřice podle obrázku 1, kterýžto polypeptid je modifikován substitucí v nebo delecí před nebo za jedním nebo více aminokyselinových zbytků podle obrázku 1, 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, R267, 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, O335, T404, G413, V414, G415, Q416, H417, Q418, M419, W420, A421, A422, L434, S435, A437, G438, L439, G440, A441, M442, G443, D467, S468, 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, funkčních ekvivalentů kteréhokoliv z výše uvedených; inzercí nebo delecí mezi Q124 a H150 podle obrázku 1 nebo jejich funkčních ekvivalentů; inzercí nebo delecí mezi G300 a D324 podle obrázku 1 nebo jejich funkčních ekvivalentů; a jakékoliv kterýchkoliv z výše uvedených.

Mutace, ať zavedené do polypeptidu podle obrázku 1 nebo do ekvivalentních pozic v jiném rostlině AHAS genu, mohou obsahovat alterace v DNA sekvenci, které vedou k prosté substituci jakékoliv jedné nebo více aminokyselin nebo delecím více než 5 aminokyselinových zbytků předcházejících nebo více než 5 aminokyselinových zbytků následujících jakémukoliv místu výše uvedenému. Vhodné aminokyselinové substituenty zahrnují, ale nejsou omezeny na, přirozeně se vyskytující aminokyseliny.

Alternativně mohou mutace obsahovat alterace v DNA sekvenci takové, že je jedna nebo více aminokyselin přidáno nebo deletováno v rámečku ve výše uvedených pozicích. Preferovaně obsahují adice okolo 3 až do asi 30 nukleotidů a delece obsahují asi od 3 do 30 nukleotidů. Kromě toho, jednotlivý mutantní polypeptid může obsahovat více než jednu podobnou nebo různou mutaci.

05.01.93

Předkládaný vynález obsahuje DNA a korespondující RNA sekvence, stejně jako sense a antisense sekvence. Sekvence nukleové kyseliny kodující AHAS polypeptidy mohou být obklopeny přirozenými AHAS regulačními sekvencemi, včetně promotorů, enhancerů, odpovídajících elementů, signálních sekvencí, polyadenylačních sekvencí, intronů, 5'- a 3'- nekodujících regionů, a podobně. Dále, nukleové kyseliny mohou být modifikovány pro změnu stability, rozpustnosti, vazebné afinity a specificity. Například, kodující sekvence pro variantní AHAS může být selektivně methylována. Sekvence nukleové kyseliny podle předkládaného vynálezu může být také modifikována značkou schopnou poskytnutí detegovatelného signálu, buď přímo nebo nepřímo. Příkladné značky zahrnují radioizotopy, fluorescentní molekuly, biotin a podobně.

Vynález také poskytuje vektory obsahující nukleové kyseliny kodující AHAS varianty. Velké množství vektorů, včetně plasmidů a houbových vektorů, bylo popsáno pro expresi v mnoha eukaryotických a prokaryotických hostitelích. Výhodně mohou vektory také obsahovat promotor operativně navázaný na AHAS kodující část. Kodovaná AHAS může být exprimována za použití jakéhokoliv vhodného vektoru a hostitelské buňky, za použití metod zde popsaných nebo citovaných nebo jinak známých odborníkům v příslušném oboru. Příklady vhodných vektorů zahrnují bez omezení na pBIN založené vektory, pBluescript vektory a pGEM vektory.

Předkládaný vynález také obsahuje jak variantní na herbicid rezistentní polypeptidy, tak jejich peptidové fragmenty. Jak bylo vysvětleno výše, variantní AHAS polypeptidy mohou být odvozeny od polypeptidu kukuřice ukázaného na obrázku 1 nebo od

05.01.93

jakéhokoliv rostlinného nebo mikrobiálního AHAS polypeptidu, preferovaně od rostlinného AHAS polypeptidu. Polypeptidy mohou být dále modifikovány, například, fosforylací, sulfatací, acylací, glykosylací, a jinými modifikacemi proteinů. Polypeptidy mohou být izolovány od rostlin, nebo od heterologních organismů nebo buněk (včetně, ale bez omezení, bakterií, kvasinek, hmyzích, rostlinných a savčích buněk) do kterého byl gen kodující variantní AHAS polypeptid zaveden a exprimován. Kromě toho, AHAS polypeptidy mohou být modifikovány značkou schopnou poskytnutí detegovatelného signálu, buď přímo nebo nepřímo, včetně radioizotopů, fluorescentních sloučenin, a podobně.

Chemicky rezistentní rostliny a rostliny obsahující variantní AHAS geny

Předkládaný vynález obsahuje transgenní buňky, včetně, ale nejen, semen, organismů a rostlin, do kterých byly zavedeny geny kodující AHAS varianty rezistentní na herbicidy. Neomezující příklady vhodných rostlin, do kterých mohou být zavedeny, jsou uvedeny v tabulce 1 dále:

05.01.93

Tabulka 1

Rostliny, které mohou být příjemci

Běžné jméno	Rod	Latinské jméno
Kukuřice	Gramineae	Zea mays
Kukuřice, Dent	Gramineae	Zea mays dentiformis
Kukuřice, flint	Gramineae	Zea mays vulgaris
Kukuřice, pop	Gramineae	Zea mays microsperma
Kukuřice, jemná	Gramineae	Zea mays amyloacea
Kukuřice, sladká	Gramineae	Zea mays amyleasaccharate
Kukuřice, sladká	Gramineae	Zea mays saccharate
Kukuřice, Waxy	Gramineae	Zea mays ceratina
Pšenice, Dinkel	Pooideae	Triticum spelta
Pšenice, durum	Pooideae	Triticum durum
Pšenice, anglická	Pooideae	Triticum turgidum
Pšenice, velká špalda	Pooideae	Triticum spelta
Pšenice, polish	Pooideae	Triticum polonium
Pšenice, poulard	Pooideae	Triticum monococcum
Pšenice, jednozrná	Pooideae	Triticum monococcum
Pšenice, jemná	Pooideae	Triticum aestivum
Rýže		Oryza sativa
Rýže, americká divoká	Gramineae	Zizania aquatica
Rýže, australská	Gramineae	Oryza australiensis

05.01.93

Rýže, indická	Gramineae	Zizania aquatica
Rýže, červená	Gramineae	Oryza glaberrima
Rýže, tuscarora	Gramineae	Zizania aquatica
Rýže, západoafrická	Gramineae	Oryza glaberrima
Ječmen	Pooideae	Hordeum vulgare
Ječmen	Pooideae	Hordeum irregulare
Abyssinian intermediate také iregular		
Ječmen, Ancestarl twor	Pooideae	Hordeum spontaneum
Ječmen, bezvousý	Pooideae	Hordeum trifurcatum
Ječmen, egyptský	Pooideae	Hordeum trifurcatum
Ječmen, "fourrrowed"	Pooideae	Hordeum vulgare polystichon
Ječmen, "sixrowed"	Pooideae	Hordeum vulgare hexastichon
Ječmen, "tworowed"	Pooideae	Hordeum distichon
Bavlna, Abroma	Dicotyledonaea	Abroma augusta
Bavlna, American Upland	Malvaceae	Gossypium hirsutum
Bavlna, Asiatic Tree též Indian Tree	Malvaceae	Gossypium arboreum
Bavlna, Brazilian, též Kidney, a Pernambuco	Malvaceae	Gossypium barbadense brasiliense
Bavlna, Levant	Malvaceae	Gossypium herbaceum
Bavlna, Long Silk také Long Staple,	Malvaceae	Gossypium barbadense

05.01.95

Sea Island		
Bavlna, mexican, též Short Staple	Malvaceae	Gossypium hirsutum
Sojové boby, Soja	Leguminosae	Glycine max
Cukrová řepa	Chenopodiaceae	Beta vulgaris altissima
Cukrová třtina	dřeviny	Arenga pinnata
Rajče	Solanaceae	Lycopersicon esculentum
Rajče, Cherry	Solanaceae	Lycopersicon esculentum cerasiforme
Rajče, Common	Solanaceae	Lycopersicon esculentum communae
Rajče, Currant	Solanaceae	Lycopersicon pimpinellifolium
Rajče, Husk	Solanaceae	Physalis ixocarpa
Rajče, Hyenas	Solanaceae	Solanum incanum
Rajče, Pear	Solanaceae	Lycopersicon esculentum pyriforme
Rajče, Tree	Solanaceae	Cyphomandra betacea
Lilek brambor	Solanaceae	Solanum tuberosum
Lilek brambor španělský, sladký brambor	Convolvulaceae	Ipomoea batatas

05.01.98

Zito, common	Pooideae	Secale cereale
Zito, Mountain	Pooideae	Secale montanum
Pepř, Bell	Solanaceae	Capsicum annuum grossum
Pepř, Bird též kayenský, guinejský	Solanaceae	Capsicum annuum minimum
Pepř, Bonnet	Solanaceae	Capsicum sinense
Pepř, Bullnose též sladký	Solanaceae	Capsicum annuum grossum
Pepř, Cherry	Solanaceae	Capsicum annuum cerasiforme
Pepř, Cluster, též Red Cluster	Solanaceae	Capsicum annuum fasciculatum
Pepř, Cone	Solanaceae	Capsicum annuum conoïdes
Pepř, Goat též Spur	Solanaceae	Capsicum frutescens
Pepř, Long	Solanaceae	Capsicum frutescens longum
Pepř, Oranamental Red též Wrinkled	Solanaceae	Capsicum annuum abreviatum
Pepř, Tabasco Red	Solanaceae	Capsicum annuum conoïdes
Locika, zahradní	Compositae	Lactuca sativa
Locika, Asparagus též celer	Compositae	Lactuca sativa asparagina
Locika, modrá	Compositae	Lactuca perennis
Locika, modrá	Compositae	Lactuca pulchella

05.01.95

těž Chicory		
Locika, kapusta	Compositae	Lactuca sativa capitata
těž hlávková		
Locika, Cos	Compositae	Lactuca sativa longifolia
těž Longleaf, Romaine		
Locika, Crinkle	Compositae	Lactuca sativa crispa
těž Curled Cutting Leaf		
Celer	Umbelliferae	Apium graveolens dulce
Celer, bělený, těž zahradní	Umbelliferae	Apium graveolens dulce
Celer, kořenový, tež Turniprooted	Umbelliferae	Apium graveolens rapaceum
Lilek jedlý	Solanaceae	Solanum melongena
Čirok obecný	Sorghum	všechny druhy
Tolice vojtěška	Leguminosae	Medicago sativum
Mrkev	Umbelliferae	Daucus carota sativa
Fazole, pnoucí	Leguminosae	Phaseolus vulgaris vulgaris
Fazole, Sprouts	Leguminosae	Phaseolus aureus
Fazole, Brazilian Broad	Leguminosae	Canavalia ensifformis

05.01.99

Fazole, Broad	Leguminosae	Vicia faba
Fazole, Common, též Francouzská bílá, Kidney	Leguminosae	Phaseolus vulgaris
Fazole, egyptská	Leguminosae	Dolichos lablab
Fazole, dlouhá, též Yardlong	Leguminosae	Vigna sesquipedalis
Fazole, Winged	Leguminosae	Psophocarpus tetragonolobus
Oves setý, též Common, Side Tree	Avena	Sativa
Oves černý, též Bristle Lopsided	Avena	Strigosa
Oves, Bristle	Avena	
Hrách, také zahradní zelený, Shelling	Leguminosae	Pisum sativum sativum
Hrách, Blackeyed	Leguminosae	Vigna sinensis
Hrách, Edible Podded	Leguminosae	Pisum sativum axiphium
Hrách, Grey	Leguminosae	Pisum sativum speciosum
Hrách, křídlatý	Leguminosae	Tetragonolobus purpureus
Hrách, Wrinkled	Leguminosae	Pisum sativum medullare
Slunečnice	Compositae	Helianthus annuus
Tykev, podzimní,	Dicotyledoneae	Cucurbita maxima

05.01.99

zimní		
Tykev, liánovitá	Dicotyledoneae	Cucurbita pepo
též letní		melopepo
Tykev, Turban	Dicotyledoneae	Cucurbita maxima
		turbaniformis
Okurka	Dicotyledoneae	Cucumis sativus
Okurka, africká	Dicotyledoneae	Mamordica charantia
též hořká		
Okurka, Squirting	Dicotyledoneae	Ecballium elaterium
též divoká		
Okurka, divoká	Dicotyledoneae	Cucumis anguria
Topol kalifornský	dřeviny	Populus trichocarpa
Topol, evropský		Populus nigra
černý		
Topol, šedý		Populus canescens
Topol, lombardy		Populus italica
Bříza, Silverleaf		Populus alba
též bílá		
Tabák	Solanaceae	Nicotiana
Arabidopsis	Cruciferae	Arabidopsis
thaliana		thaliana
Trávy	Lolium	
Trávy	Agrostis	
	Jiné rodiny trav	
Jetel	Leguminosae	

Expresse variant AHAS polypeptidů v transgenních rostlinách

05.01.98

uděluje vysokou hladinu rezistence na herbicidy, včetně, ale nejenom, imidazolinonových herbicidů jako je, například, imazethapyr (PURSUIT[®]), která umožňuje použití těchto herbicidů v průběhu kultivace transgenních rostlin.

Metody pro zavedení cizorodých genů do rostlin jsou v oboru známé. Neomezující příklady takovýchto metod zahrnují infekci *Agrobacterium*, bombardování částicemi, ošetření protoplastů polyethylenglykolem (PEG), elektroporaci protoplastů, mikroinjekci, makroinjekci, injekci odnoží, dráhu "pollen tube", imbibici sušených semen, perforaci laserem, a elektroforesu. Tyto metody jsou popsány v, například, B. Jenes et al., a S.W. Ritchie et al., v *Transgenic Plants*, sv. 1, Engineering and Utilization, vyd. S. D. Kung, R. WU, Academic Press, Inc., Harcourt Brace Jovanovich 1993; a L. Mannonen et al., *Criticals Reviews in Biotechnology*, 14: 287 - 310, 1994.

V preferovaném provedení je DNA kodující variantní AHAS klonována do DNA vektoru, obsahujícího markerový gen pro antibiotickou rezistenci a rekombinantní AHAS DNA, obsahující plasmid je potom zaveden do *Agrobacterium tumefaciens* obsahujícího Ti plasmid. Tento "binární vektorový systém" je popsán například v U.S. patentu č. 4.490838 a v An et al., *Plant Mol. Biol. Manual A3*: 1 - 19 (1988). Transformované *Agrobacterium* je potom ko-kultivováno s listovými disky od recipientní rostliny pro umožnění infekce a transformace rostlinných buněk. Transformované rostlinné buňky jsou potom kultivovány v regeneračním mediu, které navozuje tvorbu výhonků, nejprve za přítomnosti vhodného antibiotika pro selekci transformovaných buněk, potom za přítomnosti herbicidu. V rostlinných buňkách, které byly úspěšně transformovány DNA

05.01.98

kodující AHAS rezistentní na herbicidy se tvorba výhonků vyskytuje i za přítomnosti herbicidu, který inhibuje tvorbu výhonků z netransformovaných buněk. Po potvrzení přítomnosti variantní AHAS DNA za použití, například, polymerasové řetězové reakce (PCR) analýzy, jsou transformované buňky testovány na svou schopnost odolávat postřiku herbicidem a na svou schopnost germinace semen a iniciace kořenů a proliferace za přítomnosti herbicidu.

Jiné aplikace

Metody a kompozice podle předkládaného vynálezu mohou být použity při na struktuře založeném racionálním vývoji AHAS variant rezistentních na herbicidy, které mohou být inkorporovány do rostlin pro navození selektivní rezistence na herbicidy u rostlin. Intermediální varianty AHAS (například, varianty, které vykazují suboptimální specifickou aktivitu, ale vysokou rezistenci a selektivitu, nebo naopak) jsou užitečné jako templáty pro vývoj druhé generace AHAS variant, která si uchovává specifickou aktivitu a vysokou rezistenci a selektivitu.

Geny pro AHAS rezistentní na herbicidy mohou být transformovány do různých druhů plodin v jedné nebo v mnoha kopiích pro navození rezistence na herbicidy. Genetické zpracování plodin s redukovanou sensitivitou na herbicidy může:

- 1) zvýšit spektrum a flexibilitu aplikace specificky účinných a pro prostředí neškodných herbicidů jako jsou imidazolinonové herbicidy;

05.01.98

- 2) zvýšit komerční hodnotu těchto herbicidů;
- 3) redukovat tlak plevelu na polích zemědělských plodin účinným použitím herbicidů na herbicidy rezistentních zemědělských plodinách a v souladu s tím zvýšit výnos;
- 4) zvýšit prodej semen pro rostliny rezistentní na herbicidy;
- 5) zvýšit rezistenci na poškození rostlin z předávkování herbicidů aplikovaných při dřívějším pěstění;
- 6) snížit citlivost na změny v charakteristikách herbicidů vzniklých v důsledku vedlejších klimatických podmínek; a
- 7) zvýšit toleranci k nesprávně nebo chybně aplikovaným herbicidům.

Například, mohou být kultivovány transgenní plodiny obsahující AHAS variantní protein. Plodina může být ošetřena plevel kontrolujícím účinným množstvím herbicidu, na který je AHAS variantní transgenní rostlina rezistentní, což vede ke kontrole plevelu bez škodlivého ovlivnění kultivované plodiny.

DNA vektory popsané výše, které kodují AHAS varianty rezistentní na herbicidy mohou být dále využity tak, že exprese AHAS variant poskytuje selektovatelný marker pro transformaci buněk vektorem. Zamýšlená recipientní buňka může být v kultuře nebo in situ, a AHAS variantní gen může být použit samostatně nebo v kombinaci s jinými selektovatelnými markery. Jediným požadavkem je, aby byla recipientní buňka citlivá na cytotoxický účinek příbuzného herbicidu. Toto provedení má výhodu relativně

05.01.99

nízké ceny a chybění toxicity, například, na imidazolinonu založených herbicidů, a může být použito v jakémkoliv systému, který vyžaduje DNA mediovanou transformaci.

Příklady provedení vynálezu

Následující příklady jsou míněny jako ilustrace vynálezu bez jeho omezení.

Příklad 1: Vývoj AHAS variant rezistentních na herbicidy

Zbytky, které jsou umístěny těsně u navrhovaného vazebného místa pro herbicid podle modelu, který byl popsán výše, byly vybrány pro mutagenesy pro vývoj aktivního AHAS polypeptidu se sníženou vazebnou kapacitou pro herbicid. Každé místo na povrchu vazebné kapsy bylo uvažováno ve smyslu potenciálních interakcí s jinými zbytky v kapse, stejně jako s kofaktory a herbicidy. Například, při adici pozitivně nabitého zbytku je uvažováno, že bude interferovat s distribucí náboje uvnitř vazebného místa, což povede ke ztrátě afinity vazby negativně nabitého herbicidu.

Byly identifikovány tři zbytky jako nejvíce užitečné pro mutagenesi:

1) O F135 se soudilo, že interaguje jak s isoalloxazinovým kruhem FAD, tak s aromatickou skupinou herbicidů. V souladu se strategií zavedení více nabitých zbytků do vazebné kapsy byl tento zbytek změněn na arginin.

2) M53 kontaktuje šroubovici 498 - 507. Tato šroubovice obsahuje známá mutační místa rezistence na herbicidy a je také

05.01.98

předpokládána ve vazbě TPP. Dále, o substituci kyseliny glutamové v pozici 53 se soudí, že usnadňuje interakci s K185, což redukuje afinitu K185 ke karboxylátové skupině imazethapyru.

3) R128 je umístěn poblíž vchodu do kapsy, kde se soudí, že se účastní počátečního transportu nabitých herbicidů do vazebné kapsy. Tento zbytek byl změněn na alanin pro odstranění jeho náboje a jeho dlouhého hydrofobního postranního řetězce.

Příklad 2: Místně řízená mutageneze AHAS pro produkci variant rezistentních na herbicidy

Arabidopsis AHAS gen byl insertován v rámečku na 3' konec kodujícího regionu genu pro glutathion-S-transferasu v pGEX-2T vektoru (Pharmacia). Konstrukce vektoru tímto způsobem uchovává šesti aminokyselinovou thrombin rozpoznávající sekvenci ve spojení exprivovaného glutathion-S-transferasa/AHAS fúzního proteinu. Trávení thrombinem exprivovaného fúzního proteinu vede k AHAS proteinu s N-koncovou počáteční pozicí na konci přechodného peptidu v putativním místě pro zpracování přechodného peptidu, s reziduálním N-koncovým glycinem odvozeným od rozpoznávacího místa pro thrombin. Konečný amino-konec štěpeného AHAS proteinu se skládá z Gly-Ser-Ser-Ile-Ser. Místně řízené mutace byly zavedeny do AHAS genu v tomto vektoru.

Místně řízené mutace byly konstruovány podle PCR metody podle Higuchi (Recombinant PCR, v MA Innis, et al., PCR protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego, str. 177 - 183, 1990). Dva PCR produkty, každý přesahující mutační místo, byly amplifikovány. Primery v přesahujícím regionu obsahovaly mutace. Přesahující PCR amplifikované

05.01.98

fragментy byly kombinovány, denaturovány a tepelně zpracovány dohromady, za produkce dvou možných heteroduplexních produktů se zkrácenými 3' konci. Zkrácené 3'-konce byly rozšířeny Taq DNA polymerasou za produkce fragmentu, který byl sumou dvou přesahujících PCR produktů obsahujících požadovanou mutaci. Následující reamplifikace tohoto fragmentu s pouze dvěma "zevními" primery vedla k obohacení produktu kompletní délky. Produkt obsahující mutaci byl potom znovu zaveden do Arabidopsis AHAS genu v pGEX-2T vektoru.

Příklad 3: Exprese a purifikace AHAS variant

A. Metody

E. coli (DH5 α) buňky transformované pGEX-2T vektorem obsahujícím buď přirozený typ AHAS genu kukuřice (vektor označený pAC751), Arabidopsis Ser653Asn mutant, nebo Arabidopsis Ile401Phe mutant, byly kultivovány přes noc v LB bujónu obsahujícím 50 μ g/ml ampicilinu. Kultura *E. coli* kultivovaná přes noc byla ředěna 1:10 v 1 l LB, 50 μ g/ml ampicilinu, a 0,1% objem/objem protipěněního přípravku A. Kultura byla inkubována při 37 °C s třepáním, dokud OD₆₀₀ nedosáhlo přibližně 0,8. Byla přidána isopropylthiogalaktosa (IPTG) do konečné koncentrace 1 mM a kultura byla inkubována po další tři hodiny.

Buňky byly sklizeny centrifugací při 8670 x g po 10 minut na JA-10 rotoru a byly resuspendovány v 1/100 původního objemu kultury v MTPBS (16 mM Na₂HPO₄, 4 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7,3). Byly přidány Triton X-100 a lysozym v konečné koncentraci 1% objem/objem a 100 μ g/ml, v příslušném pořadí. Buňky byly inkubovány při 30 °C po 15 minut, ochlazeny na 4 °C na ledu a

05.01.98

byly lysovány sonikací po 10 sekund stupněm 7 s Branson Sonifier Cell Disrupter vybaveném mikrotip sondou. Buněk prostý extrakt byl centrifugován při 35000 x g po 10 minut při 4 °C. Supernatant byl slit a krok centrifugace byl opakován.

Purifikace exprivovaných fúzních proteinů byla provedena modifikovaným způsobem podle Smith a Johnson (Gene 67: 31 - 40, 1988). Supernatant byl ohřát na pokojovou teplotu a byl zaveden do 2 ml kolony glutathion-agarosových korálek (sírová vazba, Sigma) ekvilibrovaných v MTPBS. Kolona byla následně promyta MTPBS při pokojové teplotě, dokud A_{280} eluátu neodpovídal této hodnotě pro MTPBS. Fúzní protein byl potom eluován za použití roztoku obsahujícího 5 mM redukovaného glutathionu v 50 mM Tris HCl, pH 8,0. Eluovaný fúzní protein byl ošetřen přibližně 30 NIH jednotkami thrombinu a byl dialyzován proti 50 mM citrátu pH 6,5 a 150 mM NaCl.

Fúzní protein byl tráven při pokojové teplotě přes noc. Trávené vzorky byly dialyzovány proti MTPBS a pasážovány dvakrát přes glutathion agarosovou kolonu ekvilibrovanou v MTPBS pro odstranění glutathion transferasového proteinu. Proteinová frakce, která se nenavázala na kolonu, byla odebrána a byla koncentrována ultrafiltrací na YM10 filtru (Amicon). Koncentrované vzorky byly zavedeny na 1,5 x 95 cm Sephacryl S-100 gelovou filtrační kolonu ekvilibrovanou v gelovém filtračním pufru (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,0). Dvou ml frakce byly odebrány při průtoku 0,14 ml/min. Stabilita enzymu byla testována uskladněním enzymu při 4 °C v gelovém filtračním pufru s přidáním 0,02% azidu sodného a za přítomnosti nebo za absence 2 mM thiamin pyrofosfátu a 100 μ M flavin adenin dinukleotidu (FAD).

B. Výsledky

E. coli transformovaná pAC751 plasmidem obsahujícím přirozený AHAS gen downstream a v rámečku s GST genem exprivovala při indukci IPTG 91 kDa protein. 91 kDa protein vykazoval předpokládanou molekulovou hmotnost GST/AHAS fúzního proteinu (součet 26 a 65 kDa, v příslušném pořadí). Při pasážování buněk prostého extraktu DH5 α /pAC751 přes glutathion-agarosový afinitní gel, promytí a eluování volného glutathionu byl získán přípravek bohatý na 91 kDa protein (obrázek 6, linie C). Šesti aminokyselinové rozpoznávací místo pro thrombin zapracované do spojení GST a AHAS bylo úspěšně štěpeno thrombinem (obrázek 6, linie D). Přípravek štěpeného fúzního proteinu se skládal z očekávaného 26 kDa GST proteinu a 65 kDa kukuřičného AHAS proteinu. Kukuřičný AHAS protein byl purifikován do homogenity druhou pasáží přes glutathion-agarosovou kolonu pro afinitní vyloučení GST a byl podroben konečnému kroku Sephacryl S-100 gelové filtrace pro eliminaci thrombinu (Obrázek 6, linie E). 65 kDa protein je rozpoznán na western blotech monoklonální protilátkou namířenou proti kukuřičnému AHAS peptidu.

Purifikovaný přirozený kukuřičný AHAS byl analyzován elektrospreyovou hmotovou spektrometrií a bylo určeno, že má molekulovou hmotnost 64996 daltonů (data nejsou ukázána). Předpokádaná hmotnost, jak je vypočítána z určené aminokyselinové sekvence genu inzertovaného do pGEX-2T vektoru, je 65058. 0,096% diskrepance mezi empiricky určenou a předpokládanou hmotností byla v mezích variability hmotového spektrometru. Blízkost dvou určení hmotnosti naznačuje, že zde nejsou chybně inkorporované nukleotidy během konstrukce expresního vektoru, ani jakékoliv posttranslační modifikace

05.01.98

proteinu, které by mohly způsobit velké změny v molekulové hmotnosti. Kromě toho, chybění nepravých peaků v přípravku purifikovaného enzymu ukazuje, že vzorek byl prostý kontaminace.

Příklad 4: Enzymatické vlastnosti AHAS variant

Enzymatické vlastnosti přirozených a variantních AHAS produkovaných *E. coli* byly měřeny modifikací metody podle Singh et al., (Anal. Biochem., 171: 173 - 179, 1988) následovně:

Reakční směs obsahující 1 x AHAS testovací pufr (50 mM HEPES, pH 7,0, 100 mM pyruvát, 10 mM MgCl₂, 1 mM thiamin pyrofosfát (TPP) a 50 μM flavin adenin dinukleotid (FAD)) byla získána buď ředěním enzymu v 2x testovacím pufru nebo přidávkem koncentrovaného enzymu do 1x AHAS testovacího pufru. Všechny testy obsahující imazethapyr a asociované kontroly obsahovaly konečnou koncentraci 5% DMSO díky adici imazethapyru do testovací směsi jako 50% DMSO roztoku. Testy byly provedeny v konečném objemu 250 μl při 37 °C na mikrotitračních plotnách. Po umožnění vývoje reakce po 60 minut byla akumulace acetolaktátu měřena kolorimetricky jak popsal Singh et al., Anal. Biochem. 171: 173 - 179, 1988.

Kukuřičná AHAS exprivovaná a purifikovaná z pAC751 jak je popsáno v příkladu 3, výše, je aktivní v konverzi pyruvátu na acetolaktát. Celá aktivita AHAS je závislá na přítomnosti kofaktorů FAD a TPP v testovacím mediu. Žádná aktivita nebyla detegována, pokud byla přidána pouze FAD do testovacího media. Aktivita purifikovaného enzymu s pouze TPP, nebo bez kofaktorů, byla menší než 1 % aktivity detekované za přítomnosti jak TPP, tak FAD. Normálně je AHAS přítomná v surových rostliných

05.01.98

extraktech velmi labilní, zejména za absence substrátu a kofaktorů. Oproti tomu, purifikovaná AHAS z bakteriálních expresních systémů nevykazovala žádnou ztrátu katalytické aktivity, pokud byla skladována jeden měsíc při 4 °C v 50 mM HE/ES pH 7,0, 150 mM NaCl, 0,02% NaN₃ za přítomnosti nebo za absence FAD a TPP. Kromě toho, žádné degradační produkty nebyly viditelné v těchto přípravcích, pokud byly vyšetřovány na SDS-PAGE gelech.

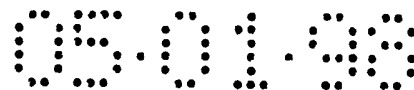
Specifické aktivity přirozené AHAS a M124E, R199A a F206R variant jsou ukázány v tabulce 2, níže. Jak je určeno ze sestavení na obrázku 5, M124E mutace v Arabidopsis AHAS je ekvivalentní M53E mutaci kukuřice, R199A mutace v Arabidopsis AHAS je ekvivalentní R128A mutaci kukuřice, a F206R mutace v Arabidopsis AHAS je ekvivalentní F135R mutaci kukuřice. Mutace vyvinuté ve strukturálním modelu kukuřičné AHAS byly použity pro identifikaci ekvivalentních aminokyselin v dvojděložním Arabidopsis AHAS genu a byly inkorporovány do a testovány v Arabidopsis AHAS genu. Tato translace a inkorporace racionálně vyvinutých herbicidových mutací do dvojděložního Arabidopsis AHAS genu mohou usnadnit hodnocení rezistence na herbicidy u dvojděložních rostlinných druhů.

Tabulka 2

Specifická aktivita

	specifická aktivita	% katalytické aktivity ve srovnání s přirozeným typem
přirozený typ	99,8	100
Met124Glu	9,15	9,16
Arg199Ala	86,3	86,5
Phe206Arg	5,07	5,1

R199A mutace udržuje vysokou hladinu katalytické aktivity (tabulka 2), zatímco vykazuje signifikantní hladinu rezistence na imazethapyr (obr. 7). Důležité je, že tato varianta si zachovává úplnou citlivost na sulfonylmočoviny (obr. 8). Tak tato varianta splňuje kritéria vysoké specifické aktivity a selektivní rezistence na herbicidy. Oproti tomu, M124E substituce vede k téměř úplné rezistenci na imazethapyr (obr. 7), ale také vykazuje vážně redukovanou katalytickou aktivitu (tabulka 2). Ve vztahu k rezistenci na imidazolinon vykazuje tato varianta vyšší citlivost na sulfonylmočovinu (obr. 8), což naznačuje, že tento zbytek je dobrým kandidátem pro vytvoření mutací, které udělají selektivně rezistenci. Substituce aminokyseliny jiné než kyseliny glutamové může napomoci uchování katalytické aktivity. F206R substituce dává podobné výsledky jako jsou ty, které jsou pozorovány u M124E varianty, ale chybí jí selektivita rezistence.



Příklad 5: Opakovaná vylepšení AHAS variant rezistentních na herbicidy za použití přístupu racionálního vývoje

Změna zbytku 124 v AHAS z Met na Glu jak je popsáno v příkladu 4 výše uděluje rezistenci na imidazolinony, ale také redukuje enzymatickou aktivitu na 9,2% hodnoty přirozeného typu. Model kukuřičné AHAS struktury popsany výše naznačuje, že Met53 (ekvivalentní Arabidopsis Met124 zbytku) interaguje se serií hydrofobních zbytků na straně α -šroubovice, která je odvozena od separátní podjednotky, ale jsou v těsné blízkosti Met53. Tak, hydrofobní interakce mezi Met53 a zbytky na šroubovici mohou stabilizovat jak asociaci podjednotka/podjednotka, tak konformaci aktivního místa. Soudilo se, že substituce hydrofobního Met zbytku s nabitým glutamatovým zbytkem s největší pravděpodobností destabilizuje inter-podjednotkové hydrofobní interakce a vede ke ztrátě katalytické aktivity.

Na základě analýz struktura/funkce byla potom aktivita původního Arabidopsis Met124Glu (ekvivalentního ke kukuřičnému Met53Glu) mutantního enzymu opakovaně vylepšena substitucí více hydrofobní aminokyseliny (Ile) v této pozici. Hydrofobní charakter Ile postraního řetězce vedl k znovunavení aktivity na úroveň přirozeného typu (specifická aktivita 102, ekvivalentní 102% aktivity přirozeného typu), ale s větší objem Ile postraního řetězce byl stále schopen udržet signifikantní hladinu rezistence na imidazolinon (obr. 9).

Při srovnání, substituce histidinového zbytku do této pozice vedla k AHAS variantě vykazující specifickou aktivitu 42,5, ekvivalentní 42,6% aktivity přirozeného typu. Tento mutant, nicméně, vykazoval vysoký stupeň rezistence na PURSUIT[®].

05.01.99

Příklad 6: Opakovaná vylepšení AHAS variant rezistentních na herbicidy za použití přístupu racionálního vývoje

Jiným příkladem opakované vylepšení za použití metod podle předkládaného vynálezu je Arg128Ala varianta. Strukturální model kukuřičné AHAS naznačuje, že Arg 128 zbytek, který je umístěn na okraj vazebného místa pro herbicid, se účastní zavádění nabitých substrátů a herbicidů do vazebného místa pro herbicid a do aktivního místa. Arg 128 je daleko od TPP skupiny, která váže iniciální molekulu pyruvátu v reakčním mechanismu AHAS, což vysvětluje, proč substituce Arabidopsis AHAS Arg 199 (ekvivalentní k kukuřičnému Arg128) za alanin má malý účinek na katalytickou aktivitu enzymu. Strukturální model dále ukazuje, že v této pozici může být provedena více radikální změna pro dosažení hladiny rezistence za udržení vysoké hladiny katalytické aktivity. Na tomto základě bylo provedeno opakované vylepšení mutace pro substituci pozitivně nabitého argininového zbytku za negativně nabitý glutamatový zbytek. Takto mutovaný enzym měl vylepšené hladiny rezistence na PURSUIT[®] za zachování vysoké úrovně aktivity (specifická aktivita 114, ekvivalentní 114% aktivity přirozeného typu) (obr. 11).

Příklad 7: Zaměnitelnost AHAS odvozených od různých druhů v na struktuře založeném racionálním vývoji AHAS variant rezistentních na herbicidy

Strukturální model trojrozměrné struktury AHAS je sestaven s jednoděložnou AHAS sekvencí jako je například ta, která je odvozena od kukuřice, jak bylo popsáno výše. Pro zavedení mutací do AHAS odvozených od dvojděložných druhů jako je Arabidopsis byly sekvence AHAS odvozené od jednoděložných a dvojděložných

druhů sestaveny za použití GAP a PILEUP programů (Genetics Computer Group, 575, Sequence Drive, Madison, WI 53711). Ekvivalentní pozice jsou určeny z počítačově generovaného sestavení. Mutace jsou potom zavedeny do dvojděložného AHAS genu jak bylo popsáno výše. Po expresi mutantního AHAS proteinu v *E. coli* a hodnocení jeho biochemických vlastností (t.j. specifické aktivity a rezistence na herbicidy) je mutantní gen zaveden do dvojděložné rostliny rostlinou transformační metodou jak byla popsána výše.

Příklad 8: Produkce rostlin rezistentních na herbicidy transformací racionálně vyvinutými AHAS geny

DNA konstrukty:

Racionálně vyvinuté AHAS variantní geny obsažené v expresních vektorech *E. coli* byly použity jako zdroj DNA restrikčních fragmentů pro nahrazení ekvivalentních restrikčních fragmentů v *Arabidopsis* AHAS genu. Tento gen je přítomen v 5,5 kb fragmentu genomové DNA, který také obsahuje *Arabidopsis* AHAS promotor, *Arabidopsis* AHAS terminační sekvenci a 5'- a 3'- sousedící DNA. Po provedení DNA sekvencování přes mutační místa pro potvrzení přítomnosti správných mutací byl celý 5,5 kb fragment z každého plasmidu insertován do na pBIN založeného rostlinného transformačního vektoru (Mogen, Leiden, Netherlands). Rostlinný transformační vektor také obsahoval neomycin fosfotransferasa II (nptII) gen pro rezistenci na kanamycin řízený 35S promotorem viru kvěťákové mozaiky. Konečný vektorový konstrukt je ukázán na obrázku 12. Vektory obsahující *Arabidopsis* AHAS geny s Met124Ile, Met124His, a Arg199Glu mutace (korespondující Met53Ile, Met53His a Arg128Glu mutacím AHAS sekvence u kukuřice

05.01.98

jak je ukázáno na obr. 1) byly označeny pJK002, pJK003, a pJK004, v příslušném pořadí.

Každý z těchto vektorů byl transformován do *Agrobacterium tumefaciens* kmene LBA4404 (R&D Life Technologies, Gaithersburg, MD) za použití transformační metody popsané v An et al., *Plant. Mol. Biol. Manual.*, A3: 1 - 19 (1988).

Transformace rostlin

Transformace listových disků *Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin 38 byla provedena podle Horshe et al., (*Science*, 227: 1229 - 1231, 1985) s drobnými modifikacemi. Listové disky byly odebrány od rostliny kultivované za sterilních podmínek a byly ko-kultivovány horní stranou dolů v Murashige Skoog mediu (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO) po 2 - 3 dny při 25 °C ve tmě se kmeny *Agrobacterium tumefaciens* obsahujícími plasmidy pJK002, pJK003, nebo pJK004. Disky byly blotovány za sucha a přeneseny do regeneračního Murashige Skoog media s B5 vitaminy obsahujícími 1 mg/l benzyladeninu a 0,1 mg/l 1-naftyloctové kyseliny, 100 mg/l kanamycinu a 500 mg/l cefotaximu (vše získáno od Sigma).

Nejprve byly transformanty selektovány rezistencí na kanamycin udílenou *nptII* genem přítomným ve transformačních vektorech. Výhonky odvozené z listových disků byly excidovány a umístěny na čerstvém Murashige Skoog hormonů prostém mediu obsahujícím cefotaxim a kanamycin.

05.01.98

In vivo rezistence na herbicidy

Tabákové výhonky rezistentní na kanamycin byly přeneseny do media obsahujícího 0,25 μ M imazethapyru. Při této koncentraci imidazolinonového herbicidu nebyly schopné netransformované tabákové výhonky (obsahující endogenní přirozený typ AHAS) iniciace tvorby kořínků. Oproti tomu, iniciace kořínků a růst byly pozorovány u tabákových výhonků transformovaných každým z mutantních AHAS genů. Kořínky vyvíjené z výhonků transformovaných Met124Ile a Arg199Glu mutantními geny spolu s přirozeným typem jsou ukázány na obrázku 1. Kromě toho, rostliny transformované Met124Ile nebo Arg199Glu mutantními geny byly rezistentní na postřik dvojnásobnou dávkou (100 g/ha) imazethapyru (obr. 13). Charakter růstu kořínků u transformovaných vs. netransformovaných rostlin stejně jako chování po postřiku herbicidem naznačují, že exprese racionálně vyvíjených genů pro rezistenci na herbicidy udílí rezistenci na herbicidy in vivo.

Detekce racionálně vyvíjených genů u tabáku rezistentního na herbicidy

Genomová DNA byla izolována od AHAS transformovaných rostlin tabáku a přítomnost Arabidopsis AHAS variantních genů byla potvrzena PCR analýzou. Rozdíly mezi nukleotidovými sekvencemi Arabidopsis AHAS genu a dvěma AHAS geny tabáku byly využity pro vývoj PCR primerů, které amplifikují pouze Arabidopsis gen na pozadí genomové DNA tabáku. Racionálně vyvinuté geny rezistence na herbicidy byly detegovány, jak je ukázáno, amplifikací DNA fragmentu správné velikosti, ve většině rostlin rezistentních na herbicidy. Žádný PCR signál nebyl pozorován u netransformovaných

05.01.93

tabákových rostlin.

Segregace transformovaných AHAS genů

Pro monitorování segregace racionálně vyvinutých AHAS genů u transformovaných rostlin byly provedeny germinační testy. Semena byla umístěna v hormonů prostém Murashige Skoog mediu obsahujícím více než 2,5 μM PURSUIT[®] a 100 μM kanamycinu. Vzniklé semenáčky byly vizuálně odečítány na rezistenci nebo na citlivost na herbicid.

Protože rostliny tabáku jsou diploidní, bylo očekáváno, že potomstvo samoopylených rostlin by mělo segregovat 3:1 rezistentní:citlivé, což odráží existenci 1 semenáčku homozygotního pro rezistentní AHAS gen, 2 semenáček heterozygotních pro rezistentní AHAS gen a 1 semenáčku postrádajícího rezistentní AHAS gen.

Výsledky ukazují, že rezistentní AHAS geny jsou segregující v očekávaném poměru 3:1, což podporuje závěr, že rezistence na herbicidy je udílána jednou, dominantní kopií racionálně vyvíjeného AHAS genu.

Tyto výsledky ukazují, že racionální vývoj genů AHAS rezistentní na herbicidy může být použit pro produkci rostlin, které vykazují na herbicidy rezistentní růst in vivo.

Příklad 9: Produkce rostlin zkríženě rezistentních na různé herbicidy transformací racionálně vyvinutými AHAS geny

05.01.98

Tabákové rostliny transformované racionálně vyvinutými AHAS geny jak bylo popsáno v příkladu 8, výše, byly také testovány na zkříženou rezistenci na jiný herbicid, CL 299263 (také známý jako imazamox). Germinační testy byly provedeny na semenech získaných od primárních transformantů obsahujících Met124Ile, Met124His a Arg199Glu Arabidopsis AHAS variantní geny, za přítomnosti nebo za absence 2,5 μ M CL 299263 (obr. 15). Tato koncentrace herbicidu způsobuje těžkou zakrslost a odbarvení přirozených rostlin tabáku. Tabákové rostliny transformované Met124His genem vykazovaly vyšší hladinu rezistence (obr. 15). Arg199Glu transformanty vykazovaly střední hladinu rezistence, zatímco Met124Ile vykazovaly slabou rezistenci (obr.15).

Všechny patenty, aplikace, články, publikace a testovací metody jsou zde uvedeny jako odkazy.

Mnoho variací předkládaného vynálezu bude odborníkům v oboru zřejmých ve světle výše uvedeného podrobného popisu. Takové variace spadají plně do rozsahu připojených patentových nároků.

P a t e n t o v é n á r o k y

1. Způsob modelování založený na struktuře pro produkci AHAS variantního proteinu rezistentního na herbicidy v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje:

(a) sestavení cílového AHAS proteinu na pyruvát oxidasovém templátu nebo ekvivalentu AHAS modelování pro odvození trojrozměrné struktury uvedeného cílového AHAS proteinu;

(b) modelování jednoho nebo více herbicidů do uvedené trojrozměrné struktury pro lokalizaci vazebného místa pro herbicid v uvedeném cílovém AHAS proteinu;

(c) selekci alespoň jedné aminokyselinové pozice v uvedeném cílovém AHAS proteinu jako cíle pro mutaci, kde uvedená mutace pozměňuje afinitu alespoň jednoho herbicidu k uvedenému vazebnému místu;

(d) mutaci DNA kodující uvedený cílový AHAS protein pro produkci mutantní DNA kodující variantní AHAS obsahující uvedenou mutaci v uvedené pozici; a

(e) expresi mutované DNA v jedné buňce, za podmínek, za kterých je produkován uvedený variantní AHAS obsahující mutaci v uvedené pozici.

2. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 1

05.01.99

v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje:

(f) expresi DNA kodující přirozený AHAS protein paralelně ve druhé buňce;

(g) purifikaci uvedených přirozených a uvedených variantních AHAS proteinů z uvedených buněk;

(h) testování uvedených přirozených a uvedených variantních AHAS proteinů na katalytickou aktivitu v konverzi pyruvátu na acetolaktát nebo v kondenzaci pyruvátu a 2-ketobutyátu za tvorby acetoxybutyrátu, za absence a za přítomnosti uvedeného alespoň jednoho herbicidu; a

(i) opakování kroků (c) - (h), kde je uvedená DNA kodující uvedenou variantu v kroku (e) použita jako AHAS kodující DNA v kroku (c), dokud není identifikován první AHAS variantní protein rezistentní na herbicid, který má vlastnosti:

(i) za absence alespoň jednoho herbicidu

(a) má katalytickou aktivitu, která je sama dostatečná k tomu, aby udržela životaschopnost buněk, ve kterých je exprivován; nebo

(b) má katalytickou aktivitu v kombinaci s nějakým jiným AHAS variantním proteinem rezistentním na herbicid, který může být také exprivován v uvedené buňce, který může být stejný nebo jiný než první AHAS variantní protein, kde tato aktivita je dostatečná k tomu, aby udržela životaschopnost buněk, ve kterých je exprivován;

05.01.98

kde buňky vyžadují AHAS aktivitu pro přežívání; a

(ii) má katalytickou aktivitu, která je více rezistentní k alespoň jednomu herbicidu než je aktivita přirozené AHAS.

3. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený ekvivalent AHAS modelování je vybrán ze skupiny skládající se z transketolas, karboligas a pyruvát dekarboxylasy.

4. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 2 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená katalytická aktivita za absence uvedeného více než jednoho herbicidu je větší než asi 20 % katalytické aktivity uvedené přirozené AHAS za absence uvedeného alespoň jednoho herbicidu.

5. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 4 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený herbicid je imidazolinonový herbicid a uvedený první AHAS variantní protein rezistentní na herbicidy má:

(i) katalytickou aktivitu za absence uvedeného herbicidu vyšší než asi 20% katalytické aktivity uvedené přirozené AHAS;

(ii) katalytickou aktivitu, které je relativně více rezistentní na přítomnost imidazolinonových herbicidů ve srovnání s přirozenou AHAS; a

(iii) katalytickou aktivitu, která je relativně více citlivá na přítomnost sulfonylmočovinných herbicidů ve srovnání s imidazolinonovými herbicidy.

05.01.98

6. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedené herbicidy jsou vybrány ze skupiny skládající se z imidazolinonů, sulfonylmočovín, triazolopyrimidinových sulfonamidů, pyrimydyl-oxy-benzoových kyselin, sulfamoylmočovín, sulfokarboxamidů, a jejich kombinací.

7. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený cílový AHAS protein je odvozen od *Arabidopsis thaliana*.

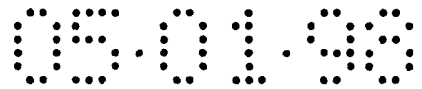
8. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedenou první buňkou je *E. coli*.

9. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 2 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedenými prvními a druhými buňkami jsou *E. coli*.

10. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený cílový AHAS protein obsahuje protein mající sekvenci podle obrázku 1 nebo jeho funkční ekvivalent.

11. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená mutace je vybrána ze skupiny, která se skládá z:

(i) substituce alespoň jedné jiné aminokyseliny za aminokyselinový zbytek sekvence podle obrázku 1 vybraný ze skupiny skládající se z 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, R267, 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, O335, T404, G413, V414, G415, Q416, H417, Q418, M419, W420, A421, A422, L434, S435, A437, G438, L439, G440, A441, M442, G443, D467, S468, 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 a G584, funkčních ekvivalentů kteréhokoliv z výše uvedených a jakékoliv kombinace kteréhokoliv z výše uvedených.

(ii) delece více než 5 aminokyselinových zbytků předcházejících, nebo více než 5 aminokyselinových zbytků následujících alespoň jednomu aminokyselinovému zbytku sekvence podle obrázku 1 vybraného ze skupiny, která se skládá z 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, R267, 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, O335, T404, G413, V414, G415, Q416, H417, Q418, M419, W420, A421, A422, L434, S435, A437, G438, L439, G440, A441, M442, G443, D467, S468, 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, funkčních ekvivalentů kteréhokoliv z výše uvedených a jakékoliv

05.01.98

kombinace kteréhokoliv z výše uvedených;

(iii) delece alespoň jednoho aminokyselinového zbytku nebo jeho funkčního ekvivalentu mezi Q124 a H150 sekvence podle obrázku 1;

(iv) adice alespoň jednoho aminokyselinového zbytku nebo jeho funkčního ekvivalentu mezi Q124 a H150 sekvence podle obrázku 1;

(v) delece alespoň jednoho aminokyselinového zbytku nebo jeho funkčního ekvivalentu mezi G300 a D324 sekvence podle obrázku 1;

(vi) adice alespoň jednoho aminokyselinového zbytku nebo jeho funkčního ekvivalentu mezi G300 a D324 sekvence podle obrázku 1; nebo

(vii) jakoukoliv kombinací kteréhokoliv z výše uvedených.

12. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 11 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená substituce je vybrána ze skupiny skládající se z Met53Trp, Met53Glu, Met53Ila, Met53His, Arg128Ala, Arg128Glu, Phe153Arg, Ile330Phe, funkčních ekvivalentů kteréhokoliv z výše uvedených nebo kombinace kterýchkoliv z výše uvedených.

13. Způsob modelování založený na struktuře pro produkci AHAS variantního proteinu rezistentního na herbicidy v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený způsob obsahuje:

(a) sestavení cílového AHAS proteinu na prvním AHAS templátu odvozeném od polypeptidu majícího sekvenci podle obrázku 1 nebo

05.01.98

jeho funkčním ekvivalentu pro odvození trojrozměrné struktury cílového AHAS proteinu;

(b) modelování jednoho nebo více herbicidů do uvedené trojrozměrné struktury pro lokalizaci vazebného místa pro herbicid v uvedeném cílovém AHAS proteinu;

(c) selekci alespoň jedné aminokyselinové pozice v uvedeném cílovém AHAS proteinu jako cíle pro mutaci, kde uvedená mutace pozměňuje afinitu alespoň jednoho herbicidu k uvedenému vazebnému místu;

(d) mutaci DNA kodující uvedený cílový AHAS protein pro produkci mutantní DNA kodující variantní AHAS obsahující uvedenou mutaci v uvedené pozici; a

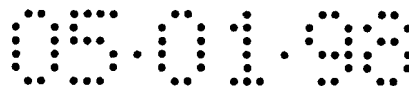
(e) expresi mutované DNA v jedné buňce, za podmínek, za kterých je produkován uvedený variantní AHAS obsahující mutaci v uvedené pozici.

14. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 13 v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje:

(f) expresi DNA kodující přirozený AHAS protein paralelně ve druhé buňce;

(g) purifikaci uvedených přirozených a uvedených variantních AHAS proteinů z uvedených buněk;

(h) testování uvedených přirozených a uvedených variantních AHAS proteinů na katalytickou aktivitu v konversi pyruvátu na



acetolaktát nebo v kondensaci pyruvátu a 2-ketobutyrátu za tvorby acetoxybutyrátu, za absence a za přítomnosti uvedeného alespoň jednoho herbicidu; a

(i) opakování kroků (c) - (h), kde je uvedená DNA kodující uvedenou variantu v kroku (e) použita jako AHAS kodující DNA v kroku (c), dokud není identifikován první AHAS variantní protein rezistentní na herbicid, který má vlastnosti:

(i) za absence alespoň jednoho herbicidu

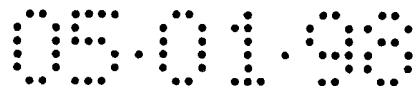
(a) má katalytickou aktivitu, která je sama dostatečná k tomu, aby udržela životaschopnost buněk, ve kterých je exprivován; nebo

(b) má katalytickou aktivitu v kombinaci s nějakým jiným AHAS variantním proteinem rezistentním na herbicid, který může být také exprivován v uvedené buňce, který může být stejný nebo jiný než první AHAS variantní protein, kde tato aktivita je dostatečná k tomu, aby udržela životaschopnost buněk, ve kterých je exprivován;

kde buňky vyžadují AHAS aktivitu pro přežívání; a

(ii) má katalytickou aktivitu, která je více rezistentní k alespoň jednomu herbicidu než je aktivita přirozené AHAS.

15. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 14 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená katalytická aktivita za absence uvedeného více než jednoho herbicidu je větší než asi 20 % katalytické aktivity uvedené přirozené AHAS.



16. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 15 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený herbicid je imidazolinonový herbicid a uvedený první AHAS variantní protein rezistentní na herbicidy má:

(i) katalytickou aktivitu za absence uvedeného herbicidu vyšší než asi 20% katalytické aktivity uvedené přirozené AHAS;

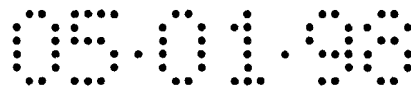
(ii) katalytickou aktivitu, které je relativně více rezistentní na přítomnost imidazolinonových herbicidů ve srovnání s přirozenou AHAS; a

(iii) katalytickou aktivitu, která je relativně více citlivá na přítomnost sulfonylmočovinných herbicidů ve srovnání s imidazolinonovými herbicidy.

17. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 13 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedené herbicidy jsou vybrány ze skupiny skládající se z imidazolinonů, sulfonylmočovinných, triazolopyrimidinových sulfonamidů, pyrimydyl-oxy-benzoových kyselin, sulfamoylmočovinných, sulfokarboxamidů, a jejich kombinací.

18. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 13 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený cílový AHAS protein je odvozen od *Arabidopsis thaliana*.

19. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 13 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedenou první buňkou je *E. coli*.



20. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 19 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedenými prvními a druhými buňkami jsou E. coli.

21. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 13 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená mutace je vybrána ze skupiny, která se skládá z:

(i) substituce alespoň jedné jiné aminokyseliny za aminokyselinový zbytek sekvence podle obrázku 1 vybraný ze skupiny skládající se z 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, R267, 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, O335, T404, G413, V414, G415, Q416, H417, Q418, M419, W420, A421, A422, L434, S435, A437, G438, L439, G440, A441, M442, G443, D467, S468, 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 a G584, funkčních ekvivalentů kteréhokoliv z výše uvedených a jakékoliv kombinace kteréhokoliv z výše uvedených.

(ii) delece více než 5 aminokyselinových zbytků předcházejících, nebo více než 5 aminokyselinových zbytků následujících alespoň jednomu aminokyselinovému zbytku sekvence podle obrázku 1 vybraného ze skupiny, která se skládá z P48, G49, S52, M53, E54, A84, A95, T96, S97, G98, P99, G100, A101, V125, R127, R128, M129, I130, G131, T132, D133, F135,

05.01.99

Q136, D186, I187, T259, T260, L261, M262, G263, R267, 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, O335, T404, G413, V414, G415, Q416, H417, Q418, M419, W420, A421, A422, L434, S435, A437, G438, L439, G440, A441, M442, G443, D467, S468, 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, funkčních ekvivalentů kteréhokoliv z výše uvedených a jakékoliv kombinace kteréhokoliv z výše uvedených;

(iii) delece alespoň jednoho aminokyselinového zbytku nebo jeho funkčního ekvivalentu mezi Q124 a H150 sekvence podle obrázku 1;

(iv) adice alespoň jednoho aminokyselinového zbytku nebo jeho funkčního ekvivalentu mezi Q124 a H150 sekvence podle obrázku 1;

(v) delece alespoň jednoho aminokyselinového zbytku nebo jeho funkčního ekvivalentu mezi G300 a D324 sekvence podle obrázku 1;

(vi) adice alespoň jednoho aminokyselinového zbytku nebo jeho funkčního ekvivalentu mezi G300 a D324 sekvence podle obrázku 1; nebo

(vii) jakoukoliv kombinací kteréhokoliv z výše uvedených.

22. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 21 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená substituce je

05.01.98

vybrána ze skupiny skládající se z Met53Trp, Met53Glu, Met53Ila, Met53His, Arg128Ala, Arg128Glu, Phe153Arg, Ile330Phe, funkčních ekvivalentů kteréhokoliv z výše uvedených nebo kombinace kterýchkoliv z výše uvedených.

23. Způsob modelování založený na struktuře pro produkci AHAS variantního proteinu rezistentního na herbicidy v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený způsob obsahuje:

(a) sestavení cílového AHAS proteinu na prvním AHAS templátu majícím identifikované vazebné místo pro herbicid a majícím sekvenci podle obrázku 1 nebo jeho funkčním ekvivalentu pro odvození trojrozměrné struktury cílového AHAS proteinu;

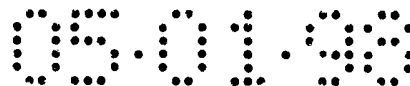
(b) selekci alespoň jedné aminokyselinové pozice v uvedeném cílovém AHAS proteinu jako cíle pro mutaci, kde uvedená mutace pozměňuje afinitu alespoň jednoho herbicidu k uvedenému vazebnému místu;

(c) mutaci DNA kodující uvedený cílový AHAS protein pro produkci mutantní DNA kodující variantní AHAS obsahující uvedenou mutaci v uvedené pozici; a

(d) expresi mutované DNA v jedné buňce, za podmínek, za kterých je produkován uvedený variantní AHAS obsahující mutaci v uvedené pozici.

24. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 23 v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje:

(e) expresi DNA kodující přirozený AHAS protein paralelně ve



druhé buňce;

(f) purifikaci uvedených přirozených a uvedených variantních AHAS proteinů z uvedených buněk;

(g) testování uvedených přirozených a uvedených variantních AHAS proteinů na katalytickou aktivitu v konverzi pyruvátu na acetolaktát nebo v kondenzaci pyruvátu a 2-ketobutyrátu za tvorby acetohydroxybutyrátu, za absence a za přítomnosti uvedeného alespoň jednoho herbicidu; a

(h) opakování kroků (b) - (g), kde je uvedená DNA kodující uvedenou variantu v kroku (d) použita jako AHAS kodující DNA v kroku (b), dokud není identifikován první AHAS variantní protein rezistentní na herbicid, který má vlastnosti:

(i) za absence alespoň jednoho herbicidu

(a) má katalytickou aktivitu, která je sama dostatečná k tomu, aby udržela životaschopnost buněk, ve kterých je exprivován; nebo

(b) má katalytickou aktivitu v kombinaci s nějakým jiným AHAS variantním proteinem rezistentním na herbicid, který může být také exprivován v uvedené buňce, který může být stejný nebo jiný než první AHAS variantní protein, kde tato aktivita je dostatečná k tomu, aby udržela životaschopnost buněk, ve kterých je exprivován;

kde buňky vyžadují AHAS aktivitu pro přežívání; a

05.01.98

(ii) má katalytickou aktivitu, která je více rezistentní k alespoň jednomu herbicidu než je aktivita přirozené AHAS.

25. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 24 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená katalytická aktivita za absence uvedeného více než jednoho herbicidu je větší než asi 20 % katalytické aktivity uvedené přirozené AHAS.

26. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 25 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený herbicid je imidazolinonový herbicid a uvedený první AHAS variantní protein rezistentní na herbicidy má:

(i) katalytickou aktivitu za absence uvedeného herbicidu vyšší než asi 20 % katalytické aktivity uvedené přirozené AHAS;

(ii) katalytickou aktivitu, které je relativně více rezistentní na přítomnost imidazolinonových herbicidů ve srovnání s přirozenou AHAS; a

(iii) katalytickou aktivitu, která je relativně více citlivá na přítomnost sulfonylmočovinných herbicidů ve srovnání s imidazolinonovými herbicidy.

27. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 23 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedené herbicidy jsou vybrány ze skupiny skládající se z imidazolinonů, sulfonylmočovinných, triazolopyrimidinových sulfonamidů, pyrimidyl-oxy-benzoových kyselin, sulfamoylmočovinných, sulfokarboxamidů, a jejich kombinací.

05.01.98

28. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 23 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený cílový AHAS protein je odvozen od *Arabidopsis thaliana*.

29. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 23 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedenou první buňkou je *E. coli*.

30. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 24 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedenými prvními a druhými buňkami jsou *E. coli*.

31. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 23 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená mutace je vybrána ze skupiny, která se skládá ze:

(i) substituce alespoň jedné jiné aminokyseliny za aminokyselinový zbytek sekvence podle obrázku 1 vybraný ze skupiny skládající se z 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, R267, 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, O335, T404, G413, V414, G415, Q416, H417, Q418, M419, W420, A421, A422, L434, S435, A437, G438, L439, G440, A441, M442, G443, D467, S468, 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 a G584, funkčních ekvivalentů kteréhokoliv z výše

05.01.98

uvedených a jakékoliv kombinace kteréhokoliv z výše uvedených.

(ii) delece více než 5 aminokyselinových zbytků předcházejících, nebo více než 5 aminokyselinových zbytků následujících alespoň jednomu aminokyselinovému zbytku sekvence podle obrázku 1 vybraného ze skupiny, která se skládá z 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, R267, 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, O335, T404, G413, V414, G415, Q416, H417, Q418, M419, W420, A421, A422, L434, S435, A437, G438, L439, G440, A441, M442, G443, D467, S468, 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, funkčních ekvivalentů kteréhokoliv z výše uvedených a jakékoliv kombinace kteréhokoliv z výše uvedených;

(iii) delece alespoň jednoho aminokyselinového zbytku nebo jeho funkčního ekvivalentu mezi Q124 a H150 sekvence podle obrázku 1;

(iv) adice alespoň jednoho aminokyselinového zbytku nebo jeho funkčního ekvivalentu mezi Q124 a H150 sekvence podle obrázku 1;

(v) delece alespoň jednoho aminokyselinového zbytku nebo jeho funkčního ekvivalentu mezi G300 a D324 sekvence podle obrázku 1;

(vi) adice alespoň jednoho aminokyselinového zbytku nebo jeho funkčního ekvivalentu mezi G300 a D324 sekvence podle obrázku 1: nebo

(vii) jakoukoliv kombinací kteréhokoliv z výše uvedených.

32. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 31 vyznačující se tím, že uvedená substituce je vybrána ze skupiny skládající se z Met53Trp, Met53Glu, Met53Ile, Met53His, Arg128Ala, Arg128Glu, Phe153Arg, Ile330Phe, funkčních ekvivalentů kteréhokoliv z výše uvedených nebo kombinace kterýchkoliv z výše uvedených.

33. Izolovaná DNA kodující kyselina hydroxyoctová variantní protein syntetasy (AHAS), kde uvedený variantní protein obsahuje AHAS protein modifikovaný:

(i) substitucí alespoň jedné jiné aminokyseliny za aminokyselinový zbytek sekvence podle obrázku 1 vybraný ze skupiny skládající se z 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, R267, 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, O335, T404, G413, V414, G415, Q416, H417, Q418, M419, W420, A421, A422, L434, S435, A437, G438, L439, G440, A441, M442, G443, D467, S468, 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,

05.01.99

P581, G583 a G584, funkčních ekvivalentů kteréhokoliv z výše uvedených a jakéhokoliv kombinace kteréhokoliv z výše uvedených.

(ii) delecí více než 5 aminokyselinových zbytků předcházejících, nebo více než 5 aminokyselinových zbytků následujících alespoň jednomu aminokyselinovému zbytku sekvence podle obrázku 1 vybraného ze skupiny, která se skládá z 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, R267, 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, O335, T404, G413, V414, G415, Q416, H417, Q418, M419, W420, A421, A422, L434, S435, A437, G438, L439, G440, A441, M442, G443, D467, S468, 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, funkčních ekvivalentů kteréhokoliv z výše uvedených a jakéhokoliv kombinace kteréhokoliv z výše uvedených;

(iii) delecí alespoň jednoho aminokyselinového zbytku nebo jeho funkčního ekvivalentu mezi Q124 a H150 sekvence podle obrázku 1;

(iv) adicí alespoň jednoho aminokyselinového zbytku nebo jeho funkčního ekvivalentu mezi Q124 a H150 sekvence podle obrázku 1;

(v) delecí alespoň jednoho aminokyselinového zbytku nebo jeho funkčního ekvivalentu mezi G300 a D324 sekvence podle obrázku 1;

05.01.98

(vi) adicí alespoň jednoho aminokyselinového zbytku nebo jeho funkčního ekvivalentu mezi G300 a D324 sekvence podle obrázku 1; nebo

(vii) jakoukoliv kombinací kteréhokoliv z výše uvedených.

34. DNA podle nároku 33, kde uvedené modifikace pozměňují schopnost herbicidu inhibovat enzymatickou aktivitu uvedeného proteinu.

35. DNA podle nároku 34, kde uvedený herbicid je vybrán ze skupiny skládající se z imidazolinů, sulfonylmočovín, triazolopyrimidinových sulfonamidů, pyrimydyl-oxy-benzoových kyselin, sulfamoylmočovín, sulfokarboxamidů, a jejich kombinací.

36. DNA podle nároku 33, kde uvedený cílový AHAS protein je odvozen od *Arabidopsis thaliana*.

37. DNA podle nároku 33, kde uvedená substituce je vybrána ze skupiny skládající se z Met53Trp, Met53Glu, Met53Ile, Met53His, Arg128Ala, Arg128Glu, Phe153Arg, Ile330Phe, funkčních ekvivalentů kteréhokoliv z výše uvedených nebo kombinace kterýchkoliv z výše uvedených.

38. DNA podle nároku 37, kde uvedený variantní AHAS protein má

(a) za absence alespoň jednoho herbicidu

(i) má katalytickou aktivitu, která je sama dostatečná k tomu, aby udržela životaschopnost buněk, ve kterých je exprivován; nebo

05.01.98

(ii) má katalytickou aktivitu v kombinaci s nějakým jiným AHAS variantním proteinem rezistentním na herbicid, který může být také exprivován v uvedené buňce, který může být stejný nebo jiný než první AHAS variantní protein, kde tato aktivita je dostatečná k tomu, aby udržela životaschopnost buněk, ve kterých je exprivován;

kde buňky vyžadují AHAS aktivitu pro přežívání; a

(b) má katalytickou aktivitu, která je více rezistentní k alespoň jednomu herbicidu než je aktivita přirozené AHAS.

39. DNA podle nároku 33, kde uvedená variantní AHAS má více než asi 20 % katalytické aktivity přirozeného typu AHAS.

40. DNA podle nároku 39, kde uvedená variantní AHAS je alespoň 2-krát více rezistentní na na imidazolinonech-založené herbicidy než na na sulfonylmočovně založené herbicidy.

41. DNA vektor obsahující DNA sekvenci podle nároku 33 operativně navázanou na transkripční regulační element.

42. Buňka obsahující DNA sekvenci kodující AHAS odvozenou od DNA vektoru podle nároku 41, kde uvedená buňka je vybrána ze skupiny skládající se z bakteriálních, houbových, rostlinných, hmyzích a savčích buněk.

43. Buňka podle nároku 42, která je rostlinou buňkou.

44. Semeno obsahující buňku podle nároku 43.

05.01.98

45. Variantní AHAS protein obsahující protein kodovaný DNA podle nároku 33.

46. Variantní AHAS protein obsahující AHAS protein modifikovaný

(i) substitucí alespoň jedné jiné aminokyseliny za aminokyselinový zbytek sekvence podle obrázku 1 vybraný ze skupiny skládající se z 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, R267, 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, O335, T404, G413, V414, G415, Q416, H417, Q418, M419, W420, A421, A422, L434, S435, A437, G438, L439, G440, A441, M442, G443, D467, S468, 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 a G584, funkčních ekvivalentů kteréhokoliv z výše uvedených a jakékoliv kombinace kteréhokoliv z výše uvedených.

(ii) delecí více než 5 aminokyselinových zbytků předcházejících, nebo více než 5 aminokyselinových zbytků následujících alespoň jednomu aminokyselinovému zbytku sekvence podle obrázku 1 vybraného ze skupiny, která se skládá z 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, R267, M277, L278, G279, H281, G282, T283, V284, G300, V301, R302, F303,

05.01.98

D304, R306, V307, T308, G309, K310, I311, E312, A313, F314,
 A315, S316, R317, A318, K319, I320, E329, I330, K332, N333,
 K334, O335, T404, G413, V414, G415, Q416, H417, Q418, M419,
 W420, A421, A422, L434, S435, A437, G438, L439, G440, A441,
 M442, G443, D467, S468, 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,
 funkčních ekvivalentů kteréhokoliv z výše uvedených a jakékoliv
 kombinace kteréhokoliv z výše uvedených;

(iii) delecí alespoň jednoho aminokyselinového zbytku nebo jeho funkčního ekvivalentu mezi Q124 a H150 sekvence podle obrázku 1;

(iv) adicí alespoň jednoho aminokyselinového zbytku nebo jeho funkčního ekvivalentu mezi Q124 a H150 sekvence podle obrázku 1;

(v) delecí alespoň jednoho aminokyselinového zbytku nebo jeho funkčního ekvivalentu mezi G300 a D324 sekvence podle obrázku 1;

(vi) adicí alespoň jednoho aminokyselinového zbytku nebo jeho funkčního ekvivalentu mezi G300 a D324 sekvence podle obrázku 1;
 nebo

(vii) jakoukoliv kombinací kteréhokoliv z výše uvedených.

47. Variantní AHAS protein podle nároku 46, kde uvedené modifikace pozměňují schopnost herbicidu inhibovat enzymatickou aktivitu uvedeného proteinu.

05.01.98

48. Variantní AHAS protein podle nároku 46, kde uvedený herbicid je vybrán ze skupiny skládající se z imidazolinonů, sulfonylmočovin, triazolopyrimidinových sulfonamidů, pyrimydyl-oxy-benzoových kyselin, sulfamoylmočovin, sulfokarboxamidů, a jejich kombinací.

49. Variantní AHAS protein podle nároku 46, kde uvedený AHAS protein je odvozen od *Arabidopsis thaliana*.

50. Variantní AHAS protein podle nároku 46, kde uvedená substituce je vybrána ze skupiny skládající se z Met53Trp, Met53Glu, Met53Ile, Met53His, Arg128Ala, Arg128Glu, Phe153Arg, Ile330Phe, funkčních ekvivalentů kteréhokoliv z výše uvedených nebo kombinace kterýchkoliv z výše uvedených.

51. Variantní AHAS protein podle nároku 46, kde uvedený variantní AHAS protein má

(a) za absence alespoň jednoho herbicidu

(i) má katalytickou aktivitu, která je sama dostatečná k tomu, aby udržela životaschopnost buněk, ve kterých je exprivován; nebo

(ii) má katalytickou aktivitu v kombinaci s nějakým jiným AHAS variantním proteinem rezistentním na herbicid, který může být také exprivován v uvedené buňce, který může být stejný nebo jiný než první AHAS variantní protein, kde tato aktivita je dostatečná k tomu, aby udržela životaschopnost buněk, ve kterých je exprivován;

kde buňky vyžadují AHAS aktivitu pro přežívání; a

(b) má katalytickou aktivitu, která je více rezistentní k alespoň jednomu herbicidu než je aktivita přirozené AHAS.

52. Variantní AHAS protein podle nároku 46, kde uvedená variantní AHAS má více než asi 20 % katalytické aktivity přirozeného typu AHAS.

53. Způsob pro udělení rezistence na herbicidy buňce v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený způsob obsahuje:

(a) klonování DNA podle nároku 33 do kompatibilního expresního vektoru; a

(b) transformování uvedené DNA do uvedené buňky za podmínek, za kterých je uvedený gen exprivován v dostatečné úrovni pro udělení rezistence na herbicid uvedené buňce.

54. Buňka připravená způsobem podle nároku 53.

55. Rostlina obsahující buňku podle nároku 54.

56. Způsob podle nároku 53 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený mutovaný gen koduje jiné aminokyseliny v alespoň jedné z pozic 53, 128, 135 nebo jejich kombinací.

57. Způsob podle nároku 56 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený AHAS gen obsahuje Arabidopsis thaliana AHAS gen.

58. Způsob podle nároku 53 v y z n a č u j í c í s e t í m,

že uvedená buňka je vybrána ze skupiny skládající se z bakteriálních, houbových, hmyzích a savčích buněk.

59. Způsob podle nároku 58 v y z n a ě u j í c í s e t í m, že uvedená buňka je rostlinná buňka.

60. Způsob podle nároku 59 v y z n a ě u j í c í s e t í m, že uvedená buňka je v semenu.

61. Způsob pro produkci AHAS proteinu rezistentního na herbicidy v y z n a ě u j í c í s e t í m, že uvedený způsob obsahuje:

(a) selekci aminokyselinové pozice v AHAS proteinu jako cíle pro mutaci;

(b) mutaci DNA kodující AHAS pro produkci mutantní DNA kodující mutaci v uvedené pozici;

(c) expresi mutované DNA v jedné buňce, za podmínek, za kterých je produkován uvedený variantní AHAS obsahující mutaci v uvedené pozici.

(d) expresi DNA kodující přirozený AHAS protein paralelně ve druhé buňce;

(e) purifikaci uvedených přirozených a uvedených variantních AHAS proteinů z uvedených buněk;

(f) testování uvedených přirozených a uvedených variantních AHAS proteinů na katalytickou aktivitu v konverzi pyruvátu na acetolaktát, za absence a za přítomnosti imidazolinonového nebo

05.01.98

sulfonylmočovinného herbicidu; a

(g) opakování kroků (a) - (g), kde je uvedena mutovaná DNA použita jako AHAS kodující DNA v kroku (b), dokud není identifikován první AHAS protein rezistentní na herbicid, který má:

(i) katalytickou aktivitu za absence uvedeného herbicidu vyšší než asi 20% katalytické aktivity uvedené přirozené AHAS;

(ii) katalytickou aktivitu, které je relativně více rezistentní na přítomnost imidazolinonových herbicidů ve srovnání s přirozenou AHAS; a

(iii) katalytickou aktivitu, která je relativně více citlivá na přítomnost sulfonylmočovinných herbicidů ve srovnání s imidazolinonovými herbicidy.

62. Způsob podle nároku 61 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedené herbicidy jsou vybrány ze skupiny skládající se z imidazolinonů, sulfonylmočovinných, triazolopyrimidinových sulfonamidů, pyrimydyl-oxy-benzoových kyselin, sulfamoylmočovinných, sulfokarboxamidů, a jejich kombinací.

63. Způsob podle nároku 61 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený cílový AHAS protein je odvozen od Arabidopsis thaliana.

64. Způsob podle nároku 61 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedenou buňkou je E. coli.



65. Způsob podle nároku 61 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený cílový AHAS protein obsahuje protein mající sekvenci podle obrázku 1.

66. Způsob podle nároku 65 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená mutace je vybrána ze skupiny, která se skládá z:

(i) substituce alespoň jedné jiné aminokyseliny za aminokyselinový zbytek sekvence podle obrázku 1 vybraný ze skupiny skládající se z 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, R267, 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, O335, T404, G413, V414, G415, Q416, H417, Q418, M419, W420, A421, A422, L434, S435, A437, G438, L439, G440, A441, M442, G443, D467, S468, 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 a G584, funkčních ekvivalentů kteréhokoliv z výše uvedených a jakékoliv kombinace kteréhokoliv z výše uvedených.

(ii) delece více než 5 aminokyselinových zbytků předcházejících, nebo více než 5 aminokyselinových zbytků následujících alespoň jednomu aminokyselinovému zbytku sekvence podle obrázku 1 vybraného ze skupiny, která se skládá z 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, R267, M277,

05.01.98

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, O335, T404, G413, V414, G415, Q416, H417, Q418, M419, W420, A421, A422, L434, S435, A437, G438, L439, G440, A441, M442, G443, D467, S468, 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, funkčních ekvivalentů kteréhokoliv z výše uvedených a jakékoliv kombinace kteréhokoliv z výše uvedených;

(iii) delece alespoň jednoho aminokyselinového zbytku nebo jeho funkčního ekvivalentu mezi Q124 a H150 sekvence podle obrázku 1;

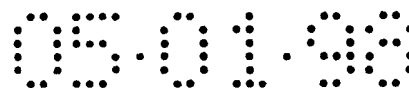
(iv) adice alespoň jednoho aminokyselinového zbytku nebo jeho funkčního ekvivalentu mezi Q124 a H150 sekvence podle obrázku 1;

(v) delece alespoň jednoho aminokyselinového zbytku nebo jeho funkčního ekvivalentu mezi G300 a D324 sekvence podle obrázku 1;

(vi) adice alespoň jednoho aminokyselinového zbytku nebo jeho funkčního ekvivalentu mezi G300 a D324 sekvence podle obrázku 1; nebo

(vii) jakoukoliv kombinací kteréhokoliv z výše uvedených.

67. Způsob podle nároku 66 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená substituce je vybrána ze skupiny skládající se z Met53Trp, Met53Glu, Met53Ila, Met53His, Arg128Ala, Arg128Glu,



Phe153Arg, Ile330Phe, funkčních ekvivalentů kteréhokoliv z výše uvedených nebo kombinace kterýchkoliv z výše uvedených.

68. Způsob pro kontrolu plevelu u plodin
v y z n a ě u j í c í s e t í m, že obsahuje kultivaci
plodin obsahujících rostliny rezistentní na herbicidy podle
nároku 55 a ošetření uvedených plodin plevel kontrolujícím
účinným množstvím uvedeného herbicidu.

69. Způsob pro kontrolu plevelu u plodin
v y z n a ě u j í c í s e t í m, že obsahuje kultivaci
plodin obsahujících rostliny rezistentní na herbicidy podle
nároku 55 a ošetření uvedených plodin plevel kontrolujícím
účinným množstvím herbicidní kompozice obsahující uvedený
herbicid.

70. Způsob modelování založený na struktuře pro přípravu
prvního herbicidu, který inhibuje aktivitu AHAS
v y z n a ě u j í c í s e t í m, že obsahuje:

(a) sestavení cílového AHAS proteinu na pyruvát oxidasovém
templátu nebo jeho funkčním ekvivalentu pro AHAS modelování pro
odvození trojrozměrné struktury uvedeného cílového AHAS proteinu;

(b) modelování jednoho nebo více herbicidů majících AHAS
inhibiční aktivitu do uvedené trojrozměrné struktury pro
odvození lokalizace, struktury nebo jejich kombinací pro vazebné
místo pro herbicid v uvedeném cílovém AHAS proteinu;

(c) vývoj non-peptidového prvního herbicidu, který bude
interagovat s AHAS aktivitou inhibicí účinné části uvedené



vazebné kapsy, kde uvedený první herbicid inhibuje uvedenou AHAS aktivitu dostatečně pro zrušení životaschopnosti buněk, které vyžadují AHAS aktivitu pro životaschopnost.

71. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 70 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený funkční ekvivalent AHAS modelování je vybrán ze skupiny skládající se z transketolas, karboligas a pyruvát dekarboxylasy.

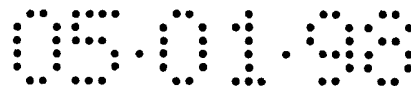
72. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 70 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený první herbicid obsahuje alespoň jednu funkční skupinu, která interaguje s funkční skupinou uvedeného vazebného místa.

73. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 70 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený první herbicid se váže na alespoň AHAS aktivitu inhibující účinnou část uvedeného vazebného místa.

74. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 70 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený první herbicid inhibuje uvedenou katalytickou aktivitu uvedené AHAS na méně než asi 20 % katalytické aktivity přirozené AHAS.

75. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 70 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený cílový AHAS protein je odvozen od *Arabidopsis thaliana*.

76. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 70 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený cílový AHAS protein obsahuje protein mající sekvenci podle obrázku 1 nebo



jeho funkční ekvivalent.

77. Způsob modelování založený na struktuře pro přípravu prvního herbicidu, který inhibuje aktivitu AHAS v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje:

(a) sestavení cílového AHAS proteinu na prvním AHAS templátu odvozeném od polypeptidu majícího sekvenci podle obrázku 1 nebo jeho funkčním ekvivalentu pro odvození trojrozměrné struktury uvedeného cílového AHAS proteinu;

(b) modelování druhého herbicidu majícího AHAS inhibiční aktivitu do uvedené trojrozměrné struktury pro odvození lokalizace, struktury nebo jejich kombinací pro vazebné místo pro herbicid v uvedeném cílovém AHAS proteinu;

(c) vývoj non-peptidového prvního herbicidu, který bude interagovat s AHAS aktivitou inhibicí účinné části uvedené vazebné kapsy, kde uvedený první herbicid inhibuje uvedenou AHAS aktivitu dostatečně pro zrušení životaschopnosti buněk, které vyžadují AHAS aktivitu pro životaschopnost.

78. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 77 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený první herbicid obsahuje alespoň jednu funkční skupinu, která interaguje s funkční skupinou uvedeného vazebného místa.

79. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 77 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený první herbicid se váže na alespoň AHAS aktivitu inhibující účinnou část uvedeného vazebného místa.

05.01.98

80. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 77 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený první herbicid inhibuje uvedenou katalytickou aktivitu uvedené AHAS na méně než asi 20 % katalytické aktivity přirozené AHAS.

81. Způsob modelování založený na struktuře podle nároku 77 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený cílový AHAS protein je odvozen od *Arabidopsis thaliana*.

82. Způsob modelování založený na struktuře pro produkci prvního herbicidu, který inhibuje aktivitu AHAS v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje:

(a) vývoj non-peptidového prvního herbicidu, který bude interagovat s AHAS aktivitou inhibicí účinné části uvedené vazebné kapsy AHAS proteinu, kde uvedený první herbicid inhibuje uvedenou AHAS aktivitu dostatečně pro zrušení životaschopnosti buněk, které vyžadují AHAS aktivitu pro životaschopnost.

83. Buňka transformovaná DNA podle nároku 33, kde je uvedená DNA exprivována v uvedené buňce v dostatečné úrovni pro udělení rezistence na herbicid uvedené buňce.

84. Rostlina transformovaná DNA podle nároku 33, kde je uvedená DNA exprivována v uvedené rostlině v dostatečné úrovni pro udělení rezistence na herbicid uvedené rostlině.

*1 *GSAASPAMP*10 *MAPPATPLRP*20 *WGPTDPRKGA*
 *60 *TRSPVIANHL*70 *FRHEQGEAFA*80 *ASGYARSSGR*
 Arg128 Phe135
 *120 *AITGQVPRRM*130 *IGTDAFQETP*140 *IVEVTRSIK*
 *180 *LVDI PKDIQQ*190 *QMAVPVWDKP*200 *MSLPGYIARL*
 *240 *ARSGEELRRF*250 *VELTGI PVT*260 *TLMGLGNFPS*
 *300 *GVRFDDRVTG*310 *KIEAFASRAK*320 *IVHVIDIDPAE*
 *360 *SKKSDFGGSW*370 *NDEL DQQKRE*380 *FPLOYKTSNE*
 *420 *WAAQYTYTKR*430 *PRQWLSSAGL*440 *GAMGFOLPAA*
 *480 *IRIENLPVKV*490 *FVLNNQHILGM*500 *VVQWEDRFYK*
 *540 *PAVRVTKKNE*550 *VRAAIKKMLE*560 *TPGPYLLDII*

Obrázek | a

3319-97
 9.01.98

A _____ A

Met 53

A 30 *DILVESLERC*40 *GVRDVFAYPG*50 *GASMEIHQAL
90 *VGVCIAITSGP*100 *GATNLVSALA*110 *DALLDSVPMV
150 *HNYLVLDVDD*160 *IPRVVQEAF*170 *LASSGRPGPV
210 *PKPPATELLE*220 *QVLRVLGESR*230 *RPVLYVGGCC
270 *DDPLSLRMLG*280 *MIIGTVYANYA*290 *VDKADLLAL
330 *IGKNKQPHVS*340 *ICADVKLALQ*350 *GMNALLEGST
390 *EIQPQYAIQV*400 *LDELTKGEAI*410 *IGTVVGQHQM
450 *AGASVANPGV*460 *TVVDIDGDGS*470 *FLMNVQELAM
510 *ANRAHTYLG*520 *PENESEIYPD*530 *FVFIKGFNI
A 570 *VPHQEIVLPM*580 *IPSGGAFKDM*590 *ILDGDGRITVY

Obrazek

lb

2/26

PV 3317-99
05.01.99

Obrázek 2b

A

A
POX *297*FVGNNY PF*305*AEVSKAFKNT*315*RYFLQIDIDP*325*AKLGRHKHTD*335*IAVLAD A*342*QKTLAAILAQ

AHAS_pred *298*ALGVRFRDDR*308*TKIEAFASR*318*AKIVHVDIDP*328*AEIGKNKQPH*338*VSICADVCLA*348*LQGMNALLEG

POX *352*VSEREST *359*PWWQANLANV*369*KNWRAYLASL*379*EDKQEGPLQA*389*YQVLRVAVNKI*399*AEPDAIYSID

AHAS_pred *358*STSKKSDFG*368*SWDELDDQK*378*REFPLGYKTS*388*NEE IQP*394*QYAIQVLDL*404*TKGEAIIIGTG

POX *409*VGDINLNANR*419*HLKLTPSNRH*429*ITSNLFATMG*439*VGIPGAIK*449*LNYPERQVFN*459*LAGDGGASMT

AHAS_pred *414*VGQHQMWAQ*424*YYTYKRPRQW*434*LSSAGLGAMG*444*FGLPAAAGAS*454*VANPGVTVVD*464*IDGDGGSFLMN

POX *469*MQDLVTQVQY*479*HLPVINVVFT*489*NCQYGFIDE*499*QEDTNQNDFI*509*GVEFNDDID F*518*SKIADGVHMQ

AHAS_pred *474*VQELAMIRIE*484*NLPVKVFLN*494*NQHLGMVVQW*504*EDRFYKANRA*514*HTYLGPNPENE*524*SEIYPDFVTI

POX *528*AFRVNKIEQL*538*PDVFEQAKAI*548*AQHEPVLIDA*558*VITGDRPLPA*568*EKLRLLDSAMS*578*SAADIEAFKQ

AHAS_pred *534*AKGFNIPAVR*544*VTKKNEVRAA*554*IKKMLETPGP*564*YLLDIIIVPHQ*574*EHVLPMPISG*584*GAFKDMILDG

POX *588*RYEAQDLQPL*598*STYLKQFGLD*608*D

AHAS_pred *594*DGRTVY * * * *

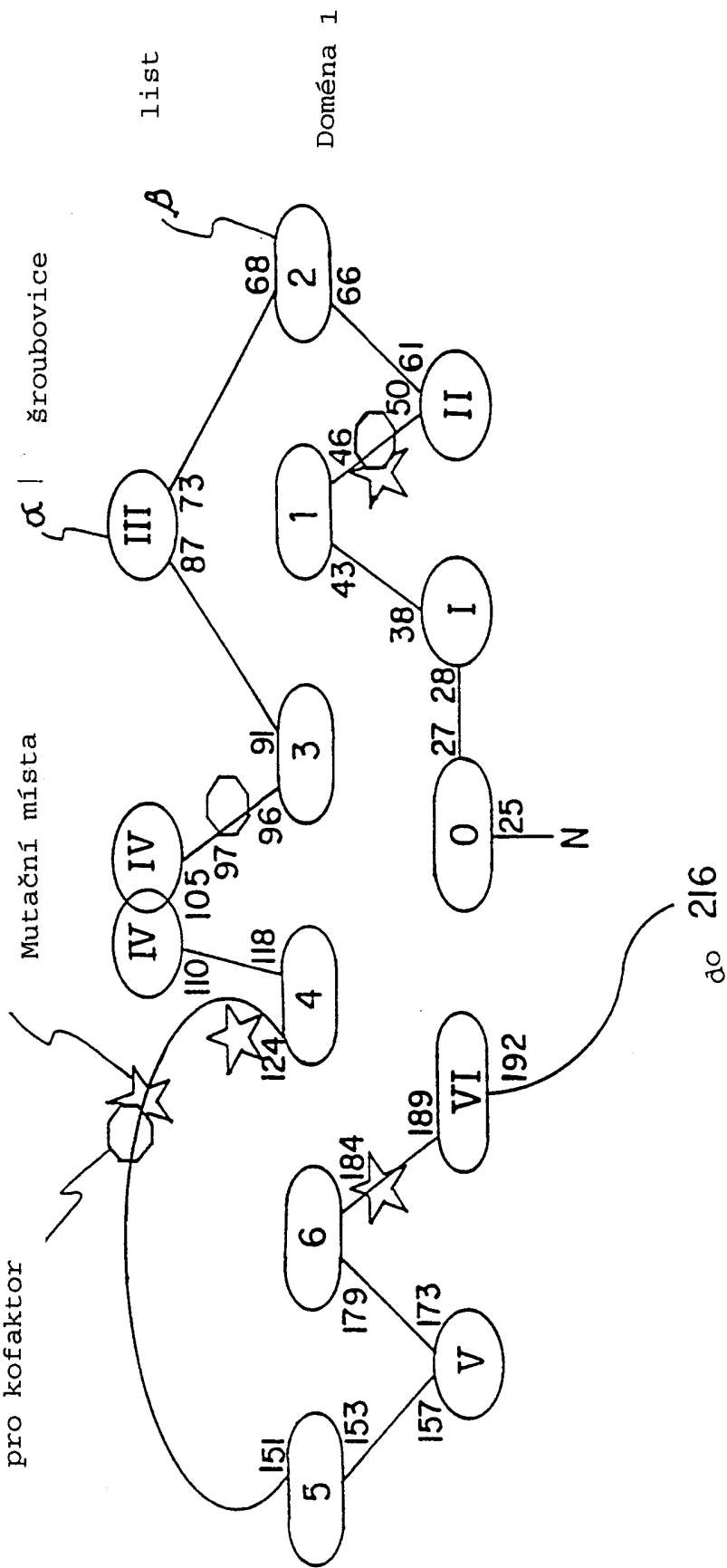


76-412 NA

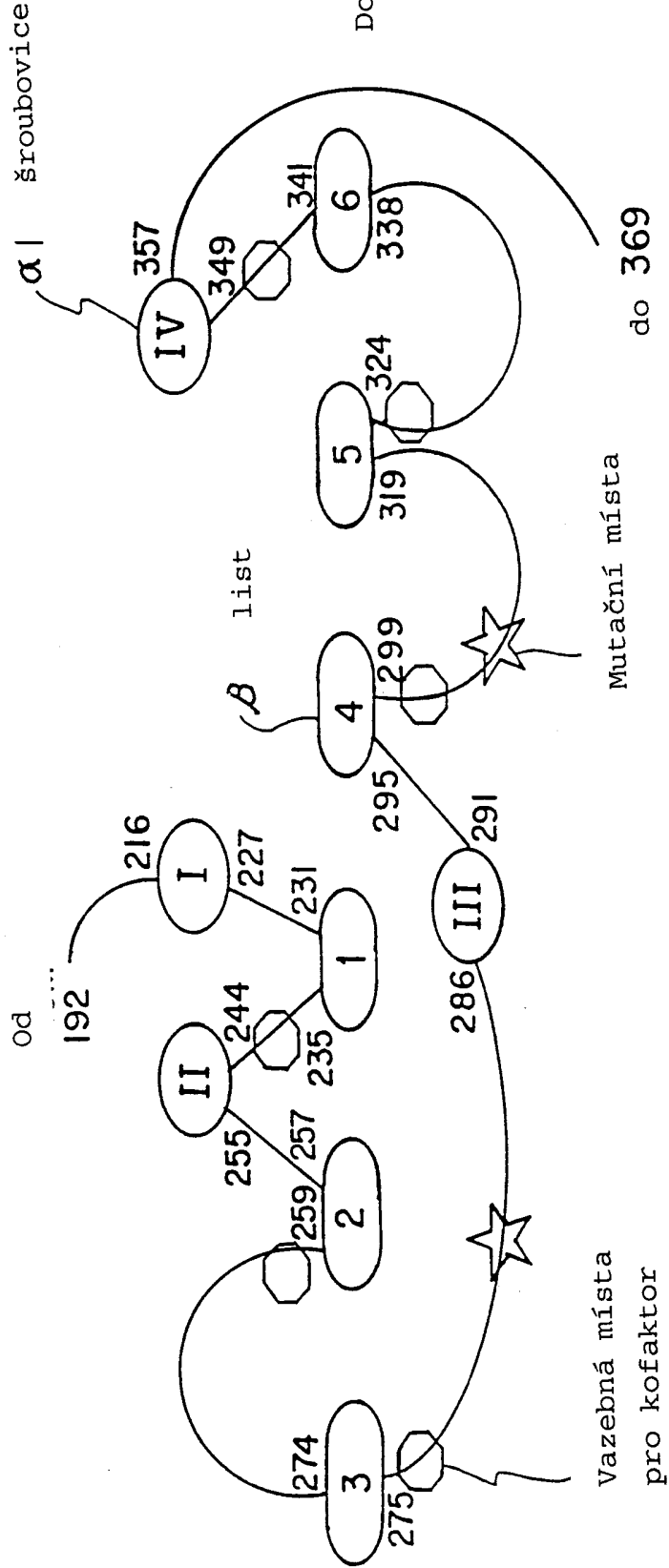
30

Obrázek

Vazebná místa R
pro kofaktor



Obrázek 3b



6/26
Doména 2

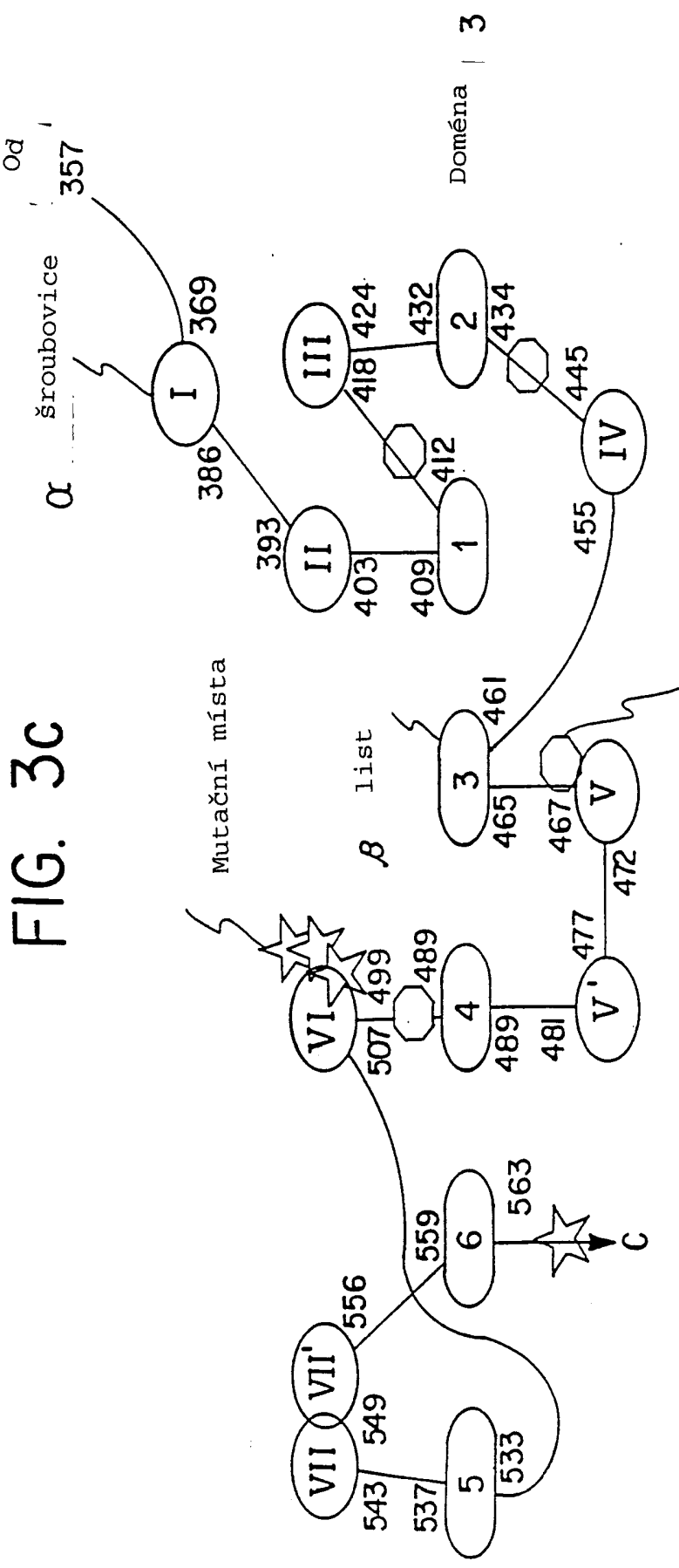
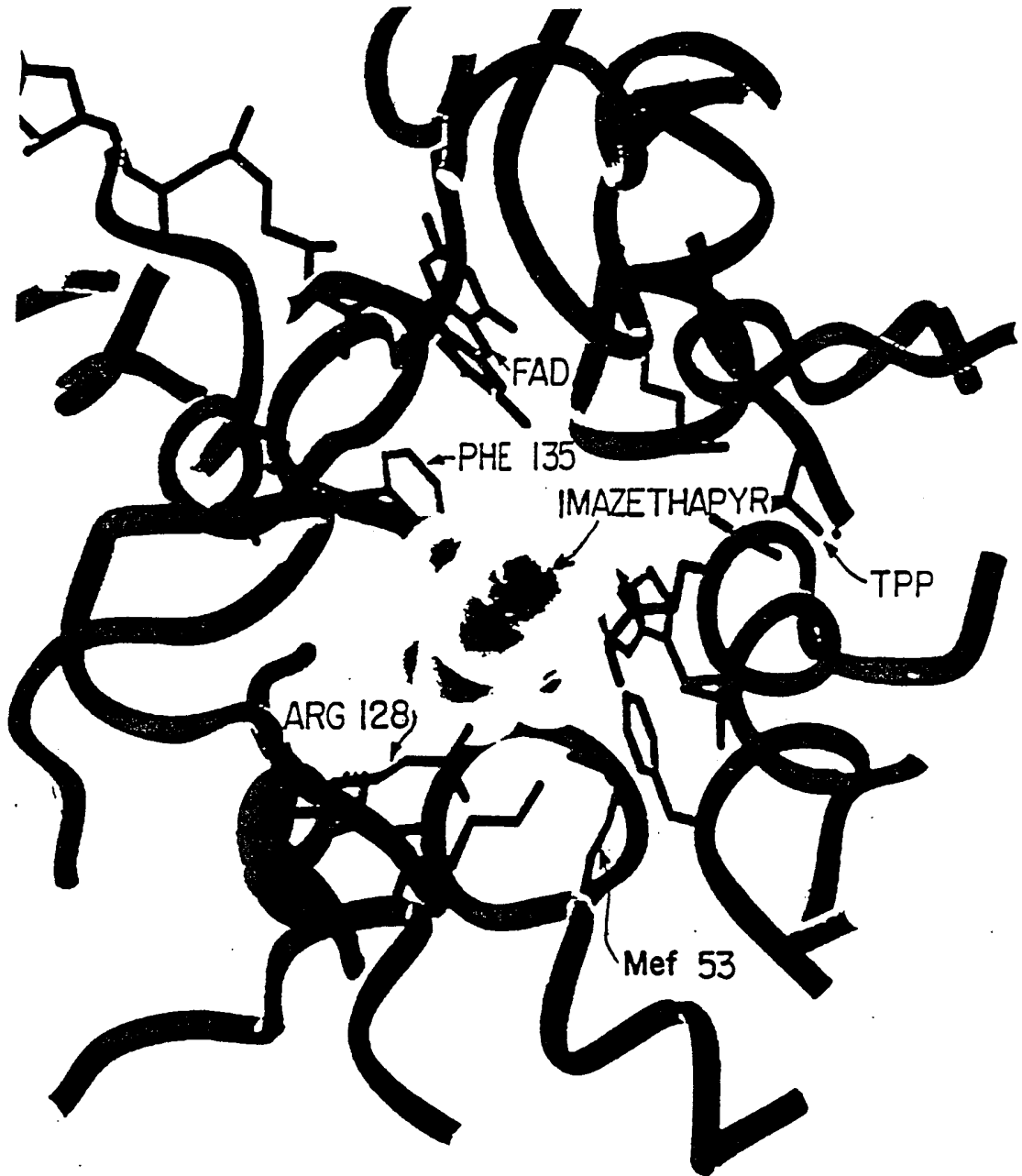


FIG. 3C

Vazebná místa
pro kofaktor

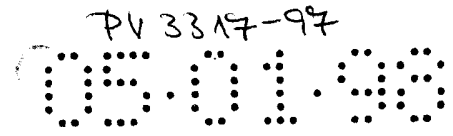
Obrázek 4



1
Pac751 MATAAAAS TALTGATTAA
Maizeals2 MATAAATAA AALTGATTAT
Maizeals1 LPRSTFFFPFH HPHKTTTPPPL
Tobac1 LPRSTFFFPFH HPHKTTTPPPL
Tobac2 ISRFSLPFSL NPNKSSSSSR
Athcsr12 ISRFSLPFSL TPQKPFSSRLH
Bnaal3 ASVFSLPVSV TTLPSFPRRR
Bnaal2 -SRFTLPFS- TPLK--P--
onsensus

51
Pac751 GSAASPAMP MAPPATPLRP WGPDPKGA
Maizeals2 RCSAASPAMP MAPPATPLRP WGPDPKGA
Maizeals1 RCSALSRAATP TAPPATPLRP WGPNEPRKGS
Tobac1 VISTNQKVSQ TEKTETFVSR FAPDEPRKGS
Tobac2 VISTQKQVSE TQKAETVFSR FAPDEPRKGS
Athcsr12 NVTTTPSPTK PTKPETFISR FAPDQPRKGA
Bnaal3 NV...APEK TDKIKTFISR YAPDEPRKGA
Bnaal2 DQDRTAS..R RENPSTFSSK YAPNVPRSGA
onsensus -S-TS-A-P T-KP-TF-SR -APDEPRKGA

100
A



7-3317-94

5c

Obrázek

B _____ B

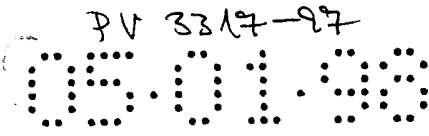
Ekvivalent kukuřičnému PHE 135

	201	↓				250
Pac751	IGTDAFQETP	IVEVTR	SITK	HNYLVLDVDD	IPRVVQE	AFF LASSGRPPGPV
Maizeals2	IGTDAFQETP	IVEVTR	SITK	HNYLVLDVDD	IPRVVQE	AFF LASSGRPPGPV
Maizeals1	IGTDAFQETP	IVEVTR	SITK	HNYLVLDVDD	IPRVVQE	AFF LASSGRPPGPV
Tobac1	IGTDAFQETP	IVEVTR	SITK	HNYLVMDVED	IPRVVRE	AFF LARSGRPPGI
Tobac2	IGTDAFQETP	IVEVTR	SITK	HNYLVMDVED	IPRVVRE	AFF LARSGRPPGPV
Athcsr12	IGTDAFQETP	IVEVTR	SITK	HNYLVMDVED	IPRIIEE	AFF LATSGRPPGPV
Bnaal3	IGTDAFQETP	IVEVTR	SITK	HNYLVMDVDD	IPRIVQE	AFF LATSGRPPGPV
Bnaal2	IGTMAFQETP	VVEVTR	TITK	HNYLVMEVDD	IPRIVRE	AFF LATSVRPPGPV
Consensus	IGTDAFQETP	IVEVTR	SITK	HNYLVMDVDD	IPRVVQE	AFF LA-SGRPPGPV

11/26

	251					300
Pac751	LVDIPKDIQQ	QMAVPV	WDKP	MSLPGYIARL	PKPPATE	LLE QVLRLVGESR
Maizeals2	LVDIPKDIQQ	QMAVPV	WDKP	MSLPGYIARL	PKPPATE	LLE QVLRLVGESR
Maizeals1	LVDIPKDIQQ	QMAVPV	WDTP	MSLPGYIARL	PKPPATE	FLE QVLRLVGESR
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	QPPEVS	QLG QIVRLISESK
Bnaal2	LIDVPKDVQQ	QFAIPN	WEQP	MRLPLYMSTM	PKPPKV	SHLE QILRLVSESK
Consensus	LVDVPKDIQQ	QLAIPN	WDQP	MRLPGYMSRL	PKPPA-	-LLE QI-RL-SESK

C _____ C

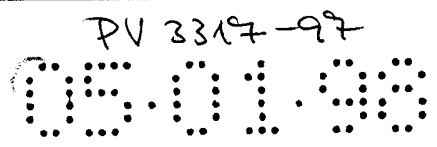


D

401
Pac751 EIGKNKQPHV SICADVKLAL QGMNALLEGS TSKKSFDGFS WDELDDQQR 450
Maizeals2 EIGKNKQPHV SICADVKLAL QGMNALLEGS TSKKSFDGFS WDELDDQQR
Maizeals1 EIGKNKQPHV SICADVKLAL QGMNTLLEGS TSKKSFDGFS WDELDDQQR
Tobac1 EIGKNKQPHV SICADIKLAL QGLNSILESK EGKLLDFSA WRQELTEQKV
Tobac2 EIGKNKQPHV SICADIKLAL QGLNSILESK EGKLLDFSA WRQELTVQKV
Athcsr12 EIGKNKTPHV SVCGDVKLAL QGMNKVLENR AEELKLDGCV WRNELNVQKQ
Bnaal3 EIGKNKTPHV SVCGDVKLAL QGMNKVLENR AEELKLDGCV WRSELSEKQK
Bnaal2 EIGKNKTPHV SVCCDVQLAL QGMNEVLENR RD. VLDGFE WRCELNEQRL
*onsensus EIGKNKQPHV SICADVKLAL QGMN-VLE- - T-KLKLDFGS WRDELD-QKR

451
Pac751 EFPLGYKTSN EEIQPQYAIQ VLDELTKGEA IIGTGVGQHQ MWAAQYYTYK 500
Maizeals2 EFPLGYKTSN EEIQPQYAIQ VLDELTKGEA IIGTGVGQHQ MWAAQYYTYK
Maizeals1 EFPLGYKIFN EEIQPQYAIQ VLDELTKGEA I IATGVGQHQ MWAAQYYTYK
Tobac1 KHPLNFKTFG DAIPPQYAIQ VLDELTINGNA IISTGVGQHQ MWAAQYYKYR
Tobac2 KYPLNFKTFG DAIPPQYAIQ VLDELTINGSA IISTGVGQHQ MWAAQYYKYR
Athcsr12 KFPLSFKTFG EAIPPQYAIK VLDELTDGKA IISTGVGQHQ MWAAQFYNYK
Bnaal3 KFPLSFKTFG EAIPPQYAIQ VLDELTDGKA IISTGVGQHQ MWAAQFYKYR
Bnaal2 KFPLRYKTFG EEIPPQYAIQ LDELTDGKA IITGVGQHQ MWAAQFYRFK
*onsensus KFPLG-KTFG E-IPPQYAIQ VLDELTKG-A IISTGVGQHQ MWAAQYY-YK

E



5f

Obrazek

E _____ E

501
 Pac751 RPRQWLSSAG LGAMGFGLPA AAGASVANPG VVVVDIDGDG SFLMNVQELA
 Maizeals2 RPRQWLSSAG LGAMGFGLPA AAGASVANPG VVVVDIDGDG SFLMNVQELA
 Maizeals1 RPRQWLSSAG LGAMGFGLPA AAGAAVANPG VVVVDIDGDG SFLMNIQELA
 Tobac1 KPRQWLTSAG LGAMGFGLPA AIGAAVGRPD EVVVVDIDGDG SFIMNVQELA
 Tobac2 KPRQWLTSAG LGAMGFGLPA AIGAAVGRPD EVVVVDIDGDG SFIMNVQELA
 Athcsr12 KPRQWLSSAG LGAMGFGLPA AIGASVANPD AIVVDIDGDG SFIMNVQELA
 Bnaal3 KPRQWLSSAG LGAMGFGLPA AIGASVANPD AIVVDIDGDG SFIMNVQELA
 Bnaal2 KPRQWLSSAG LGAMGFGLPA AMGAAIANPG AVVVVDIDGDG SFIMNIQELA
 Konsensus KPRQWLSSAG LGAMGFGLPA AIGA-VANP - VVVVDIDGDG SFIMNVQELA

14/26

551
 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 VLLLNNQHLLG MVMQWEDRFY KANRAHTYLG DPAQEDEIYP
 Bnaal3 TIRVENLPVK ILLLNNQHLLG MVMQWEDRFY KANRAHTYLG DPARENEIYP
 Bnaal2 TIRVENLPVK VLLLNNQHLLG MVLQWEDHFY AANRADSFYG DPANPEAVFP
 Konsensus TIRVENLPVK V-LLNNQHLLG MVVQWEDRFY KANRAHTYLG NP-NESEIYP

600

F

PC 3314-97
 0000000000

Obrázek 5g

		F		650	
Pac751	DFVTIAKGFN	IPAVRVTKKN	EVRAAIKKML	ETPGPYLLDI	IVPHQEHLVLP
Maizeals2	DFVTIAKGFN	IPAVRVTKKN	EVRAAIKKML	ETPGPYLLDI	IVPHQEHLVLP
Maizeals1	DFVAIAKGFN	IPAVRVTKKS	EVHAAIKKML	EAPGPYLLDI	IVPHQEHLVLP
Tobac1	NMLKFAEACG	VPAARVTHRD	DLRAAIQKML	DTPGPYLLDV	IVPHQEHLVLP
Tobac2	NMLKFAEACG	VPAARVTHRD	DLRAAIQKML	DTPGPYLLDV	IVPHQEHLVLP
Athcsr12	NMLLFAAACG	IPAAARVTKKA	DLREAIQTML	DTPGPYLLDV	ICPHQEHLVLP
Bnaal3	NMLQFAGACG	IPAAARVTKKE	ELREAIQTML	DTPGPYLLDV	ICPHQEHLVLP
Bnaal2	DMLLFAASC	IPAAARVTRRE	DLREAIQTML	DTPGPFLLDV	VCPHQDHLVLP
κonsensus	-ML-FAKACG	IPAAARVTKK-	-LRAAIQKML	DTPGPYLLDV	IVPHQEHLVLP
				673	
Pac751	MIPSGGAFKD	MILDGDGRTV	Y..		
Maizeals2	MIPSGGAFKD	MILDGDGRTV	Y*.		
Maizeals1	MIPSGGAFKD	MILDGDGRTV	Y*.		
Tobac1	MIPSGGAFKD	VITEGDGRSS	Y*.		
Tobac2	MIPSGGAFKD	VITEGDGRSS	Y*.		
Athcsr12	MIPNGGTFND	VITEGDGRIK	Y*E		
Bnaal3	MIPSGGTFKD	VITEGDGRTK	Y*.		
Bnaal2	LIPSGGTFKD	IIV*.....	...		
κonsensus	MIPSGGAFKD	VITEGDGRTV	Y--		
				G	

7V 3317-97
05.01.98

Obrazek 5h

G _____ G

Pac751 kukuřičný als2 AHAS izoenzym jak je exprivován z pac751 E. coli
coli

expresní vektor (stejný jako na obr. 1)

Maizeals2 - kukuř. als2 AHAS izozym (rostlina)

Maizeals1 - kukuř. als1 AHAS izozym (rostlina)

Tobac1 - tabák. AHAS SuRA izozym (rostlina)

Tobac2 - tabák. AHAS SuRB izozym (rostlina)

Athcsr12 - Arabidopsis thaliana Csr 1.2 AHAS gen (rostlina)

Bnaal3 - Brassica napus AHAS III izozym (rostlina)

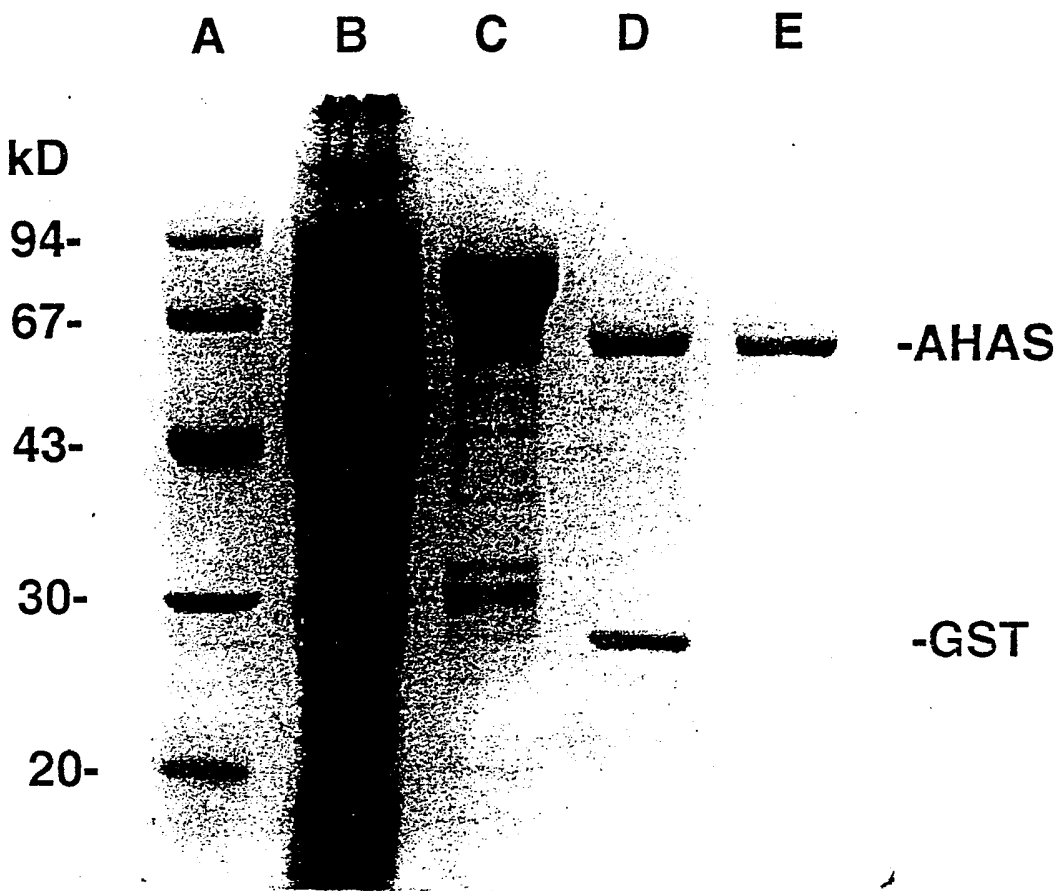
Bnaal2 - Brassica napus AHAS II izozym (rostlina)

PV 3314-97
05.01.98

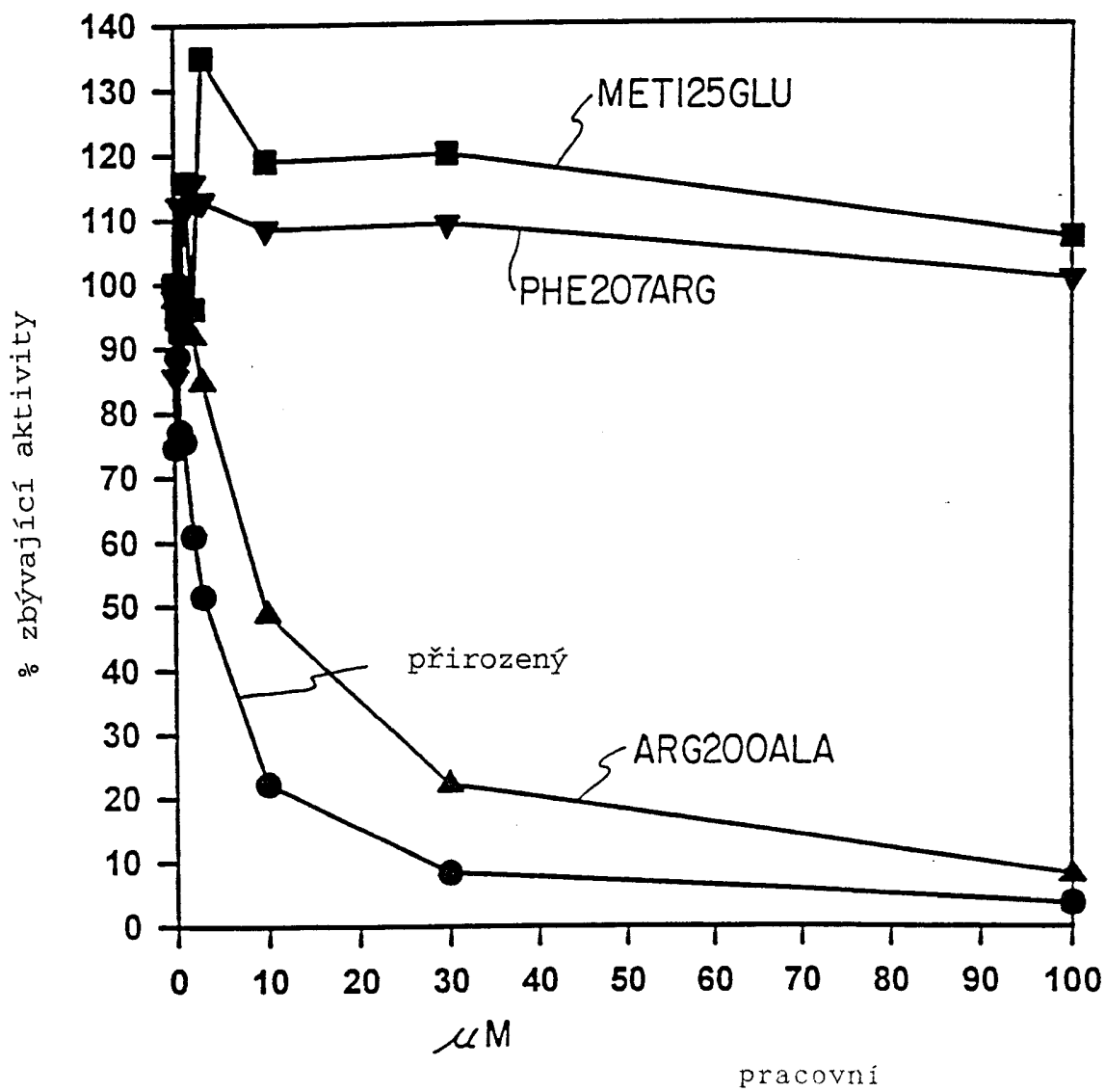
17/26

Obrázek

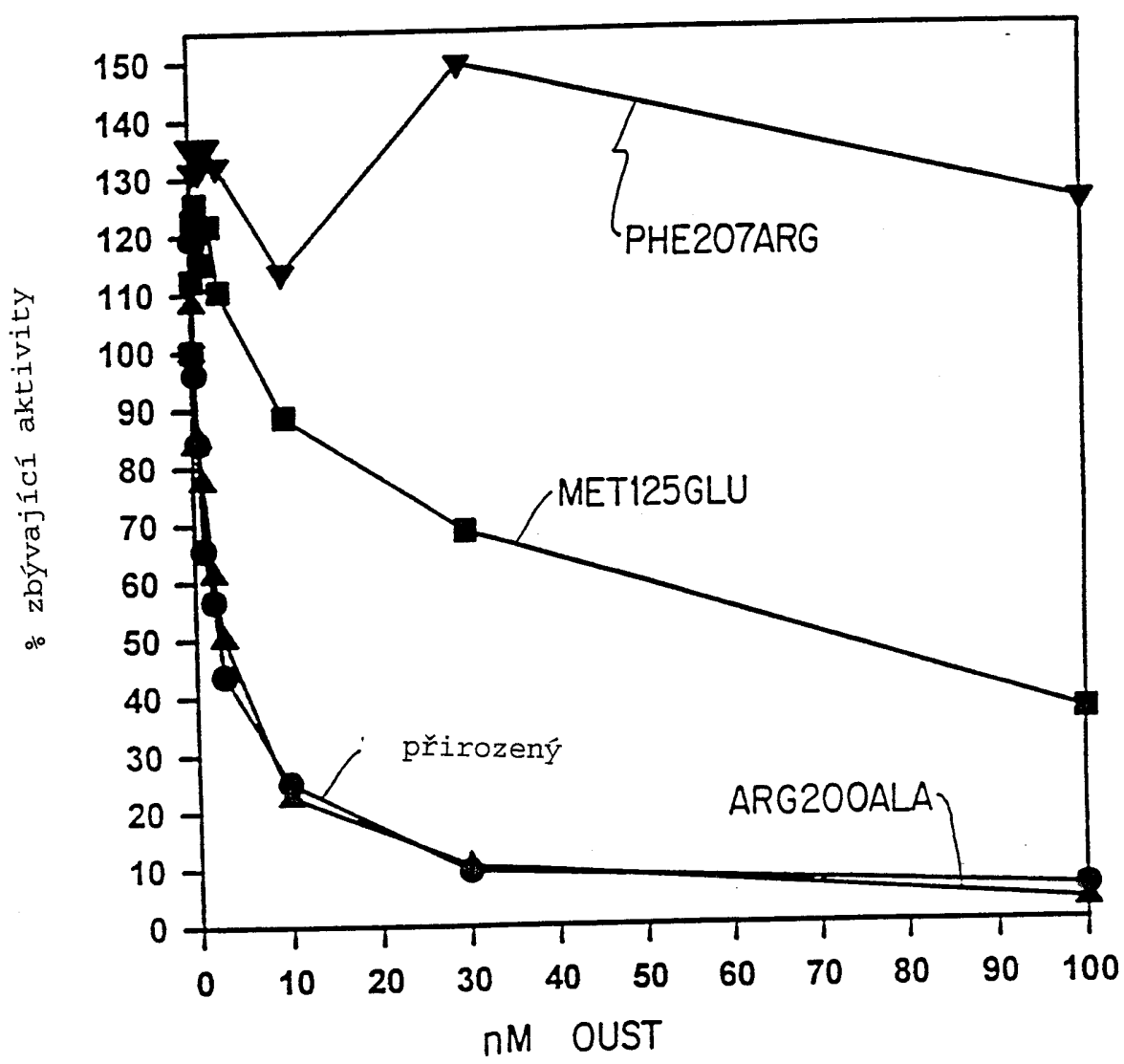
6



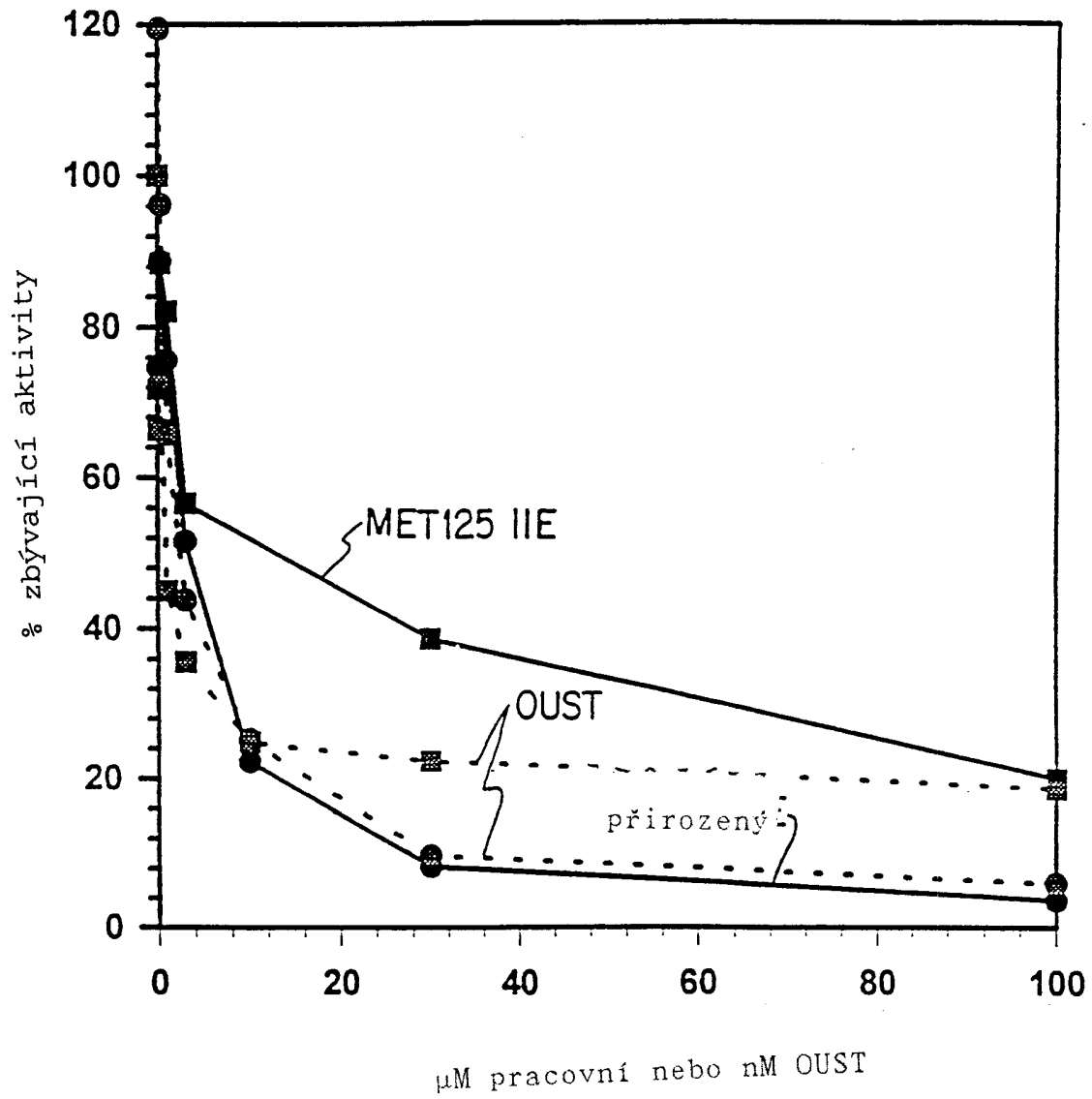
Obrázek 7



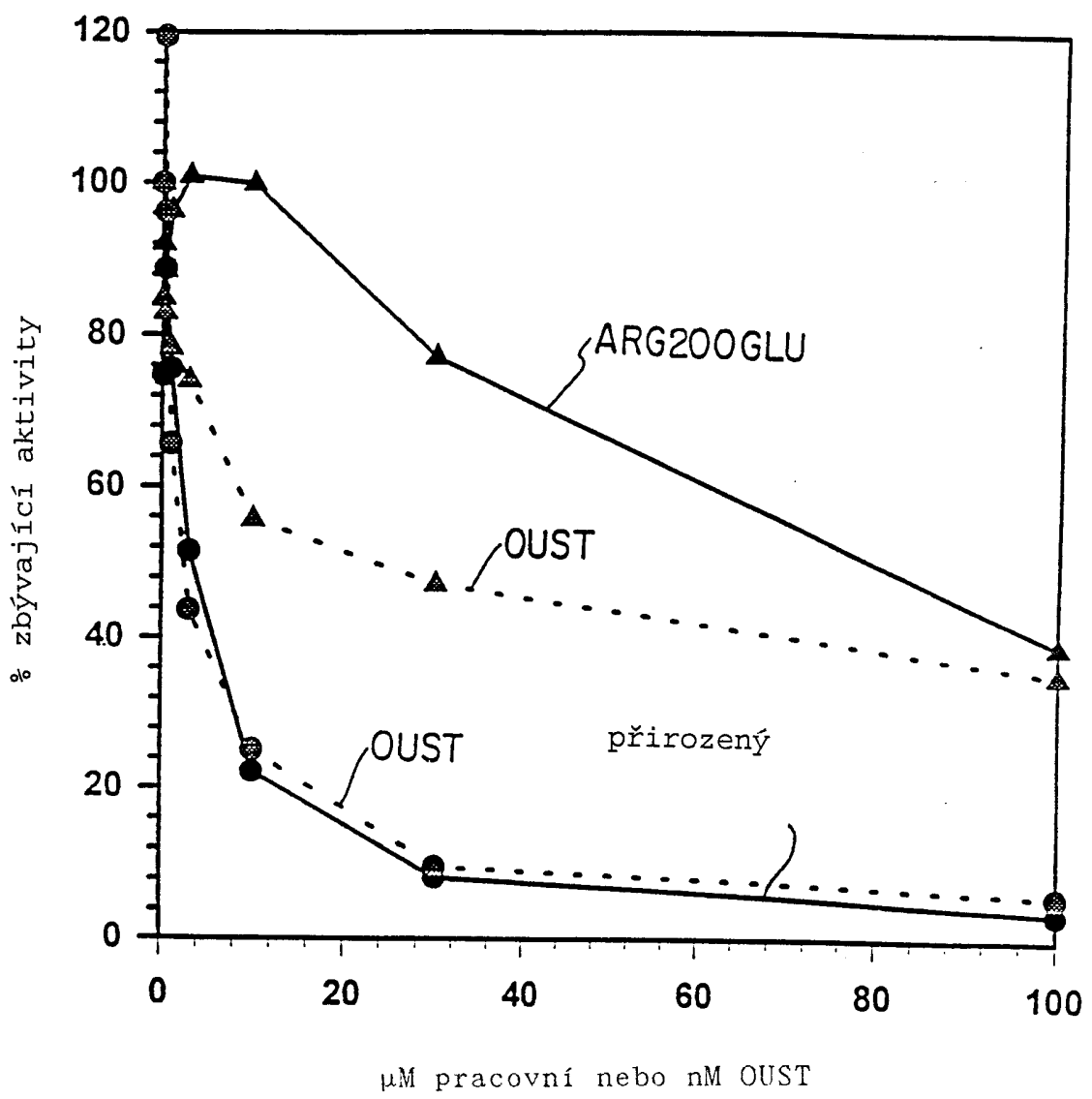
Obrázek 8



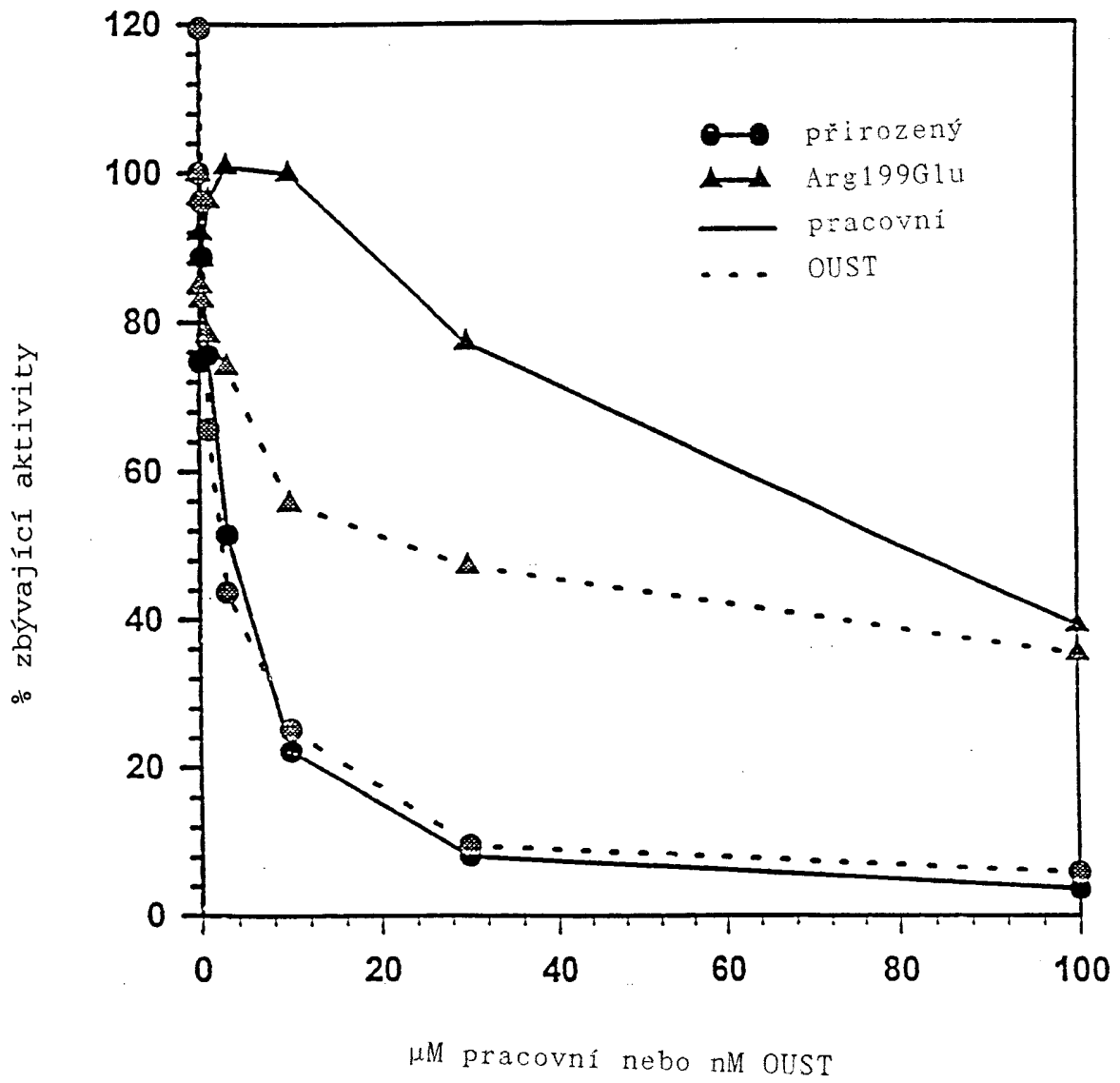
Obrázek 9



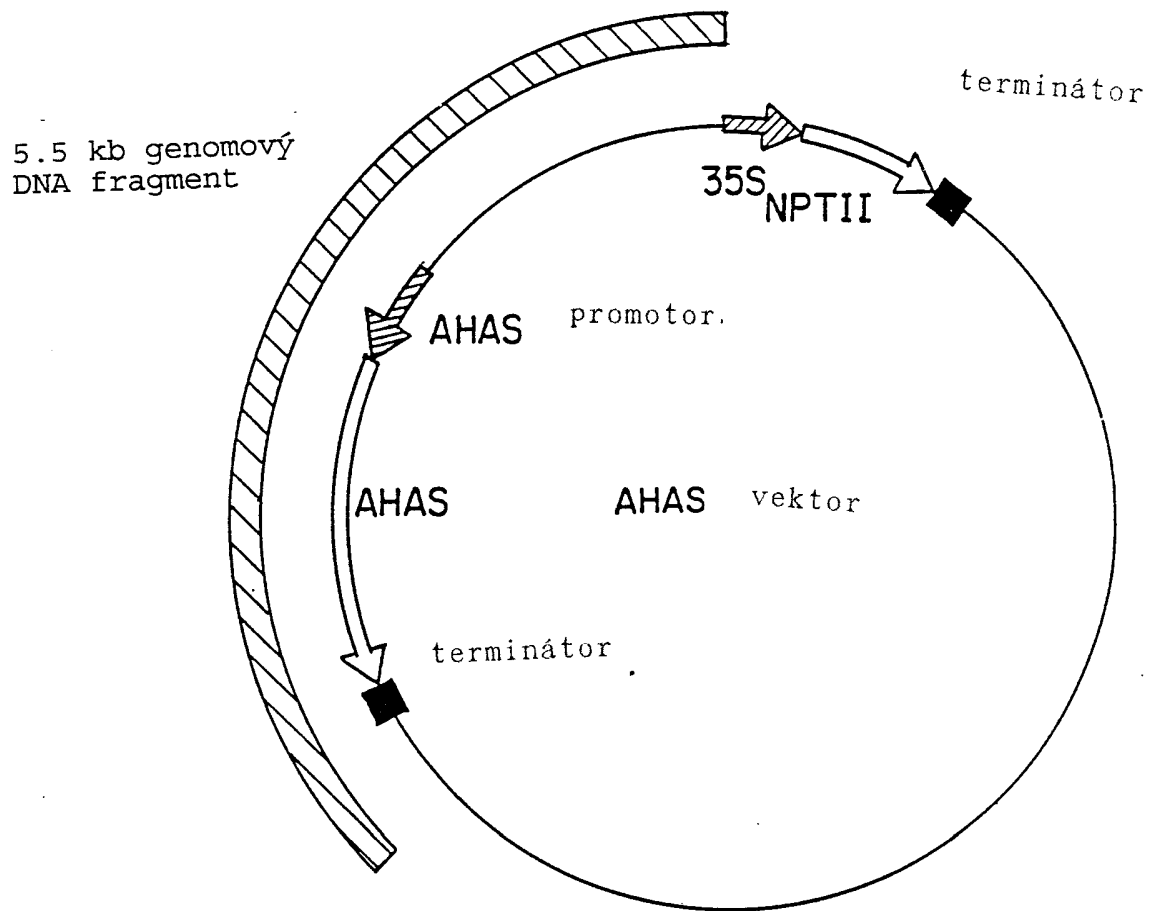
Obrázek 10



Obrázek



obrazek 12

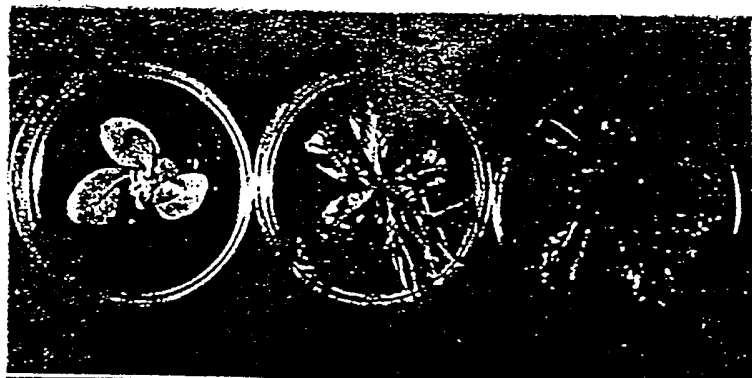


24/26

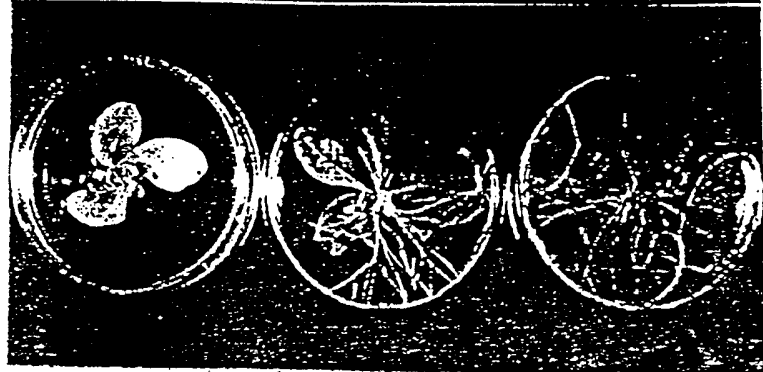
Obrázek

13

pohled zhora



pohled zdola



přirozený

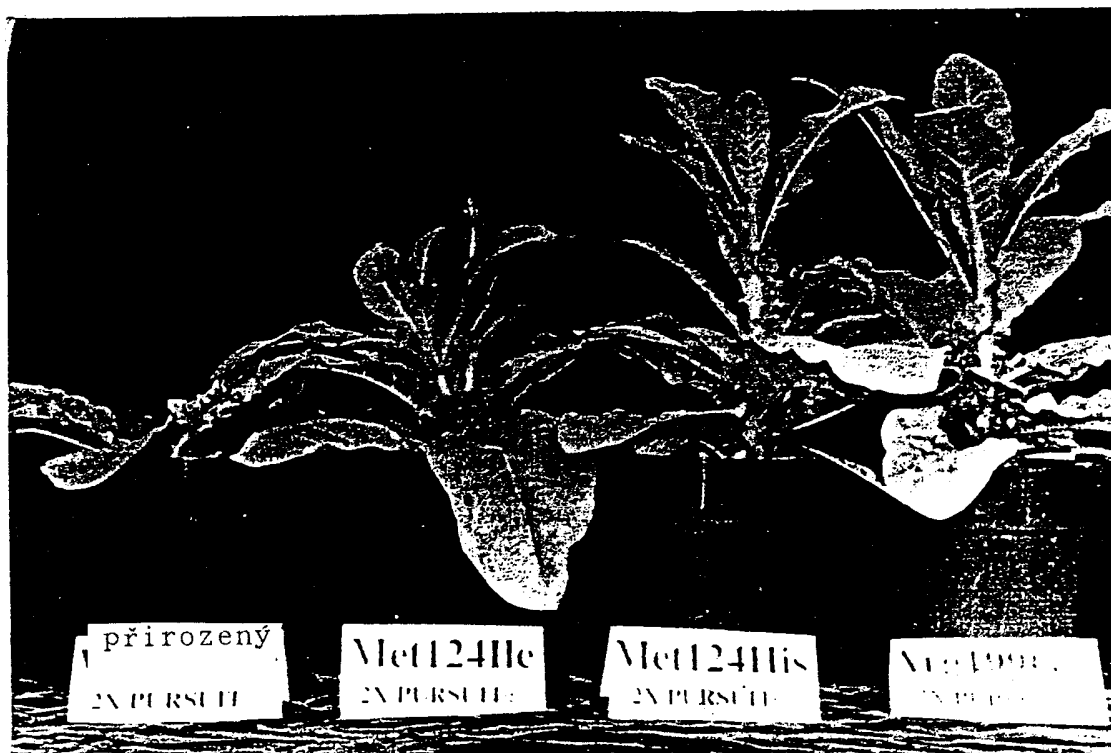
Met124Ile

Arg199Glu

25/26

Obrázek

14



Obrázek

. 15

