

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 98.949

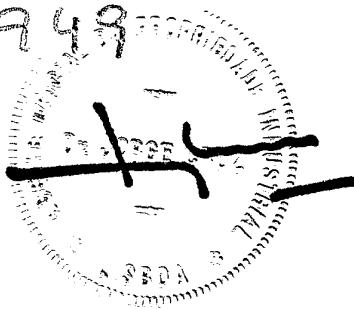
REQUERENTE: CIBA-GEIGY AG, suíça, industrial, com
sede em Klybeckstrasse 141, 4002 Basel - SUÍÇA

EPÍGRAFE: "MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE PROTEÍNA
HISTIDINOL-DESIDROGENASE E DO RESPECTIVO DNA E MUTEÍNAS
E PLANTAS TRANSGÉNICAS"

INVENTORES: ALFRED SCHEIDEGGER; ATSUKO NAGAI-HAYASHI;
ERIC R. WARD e JOHN A. RYALS

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção de Paris
de 20 de Março de 1883. 14 de Setembro de 1990 sob o No.
583.892 nos Estados Unidos da América do Norte

98.949



CIBA-GEIGY AG

"MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE PROTEÍNA HISTIDINOL-DESIDROGENASE E DO
RESPECTIVO DNA E MUTEÍNAS E PLANTAS TRANSGÊNICAS"

=====

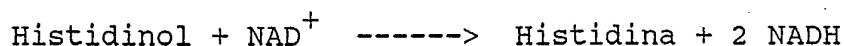
MEMÓRIA DESCRITIVA

Resumo

O presente invento diz respeito a um método para a produção de cDNA codificador de histidinol-desidrogenase de plantas, o passo final na biossíntese da histidina. O invento também compreende um novo método de purificação da histidinol-desidrogenase a partir de plantas numa forma essencialmente homogênea, a histidinol-desidrogenase purificada, um ensaio para a identificação de inibidores da histidinol-desidrogenase, um ensaio para identificar mutantes da histidinol-desidrogenase que não são inibidos pelos inibidores da histidinol-desidrogenase tipo selvagem, os inibidores assim identificados assim como composições herbicidas contendo-os, os mutantes não inibidos da histidinol-desidrogenase, plantas transgênicas contendo os mutantes não inibidos da histidinol-desidrogenase e métodos para o tratamento de ervas daninhas utilizando a aplicação de inibidores de histidinol-desidrogenase nas plantas transgênicas contendo os mutantes não inibidos da histidinol-desidrogenase.

O presente invento está relacionado com métodos de purificação de uma proteína a partir de plantas anteriormente não purificada, proteína purificada por tal método, DNA codificador de tal proteína, métodos de utilização da proteína e DNA para testar inibidores específicos da proteína relativamente a formas alteradas da proteína que são formas menos funcionais da mesma, de modo a produzir uma insensibilidade aos inibidores.

A histidinol-desidrogenase [L-Histidinol-NAD Oxi-Redutase (EC 1.1.1.23)] catalisa os dois passos finais na biossíntese do aminoácido histidina. Esta reacção é uma oxidação de histidinol para histidinal para histidina, a qual está acoplada à redução de duas moles do cofactor NAD necessário por mole de histidina formada.



Se bem que a enzima e o gene codificador da mesma tenham sido bem caracterizados na bactéria Salmonella typhimurium [Yourno e Ino (1968); Gorisch e Holke (1985); e Grubmeyer et al. (1977)] e na levedura Saccharomyces cerevisiae [Shaffer et al. (1972); Keesey et al. (1979)], esta enzima não foi anteriormente purificada até à homogeneidade a partir de quaisquer fontes vegetais. Isto é em parte devido às enzimas das funções metabólicas primárias tais como biossíntese de aminoácidos serem especialmente difíceis de purificar devido à sua baixa concentração no tecido fonte. Nas plantas, esta dificuldade é aumentada devido à existência de compostos fenólicos e outros metabolitos secundários que podem reagir com proteínas ao longo da sua purificação.

A biossíntese da histidina na generalidade nas plantas superiores não está bem estudada. Existe alguma evidência

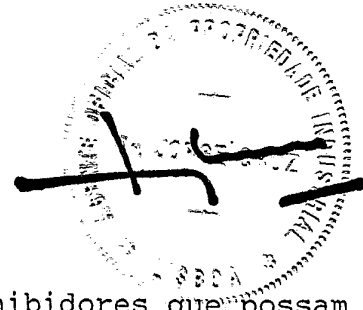
relativamente à existência nas plantas de uma via de biossíntese semelhante à existente em microorganismos foi obtida a partir de experiências in vivo usando várias plantas diferentes e uma alga azul [Dougall e Fulton (1967); Negrutiu et al. (1985); Heim et al. (1989); Yavada (1979)].

A actividade de histidinol-desidrogenase foi detectada em dez espécies de plantas diferentes: espargo, couve, pepineiro, beringela, alface, rábano [Wong e Mazelis (1981)], rosa, abóbora [Wong e Mazelis (1981)], nabo [Wong e Mazelis (1981)], frutos [Wong e Mazelis (1981) e este trabalho], rebentos e células em cultura.

Foram feitas apenas algumas tentativas para estudar as enzimas envolvidas na biossíntese da histidina nas plantas superiores. O objectivo até agora impossível de purificar até à homogeneidade qualquer enzima da biossíntese da histidina a partir de plantas parece ser o passo limitante nos estudos bioquímicos. Nos extractos brutos derivados de raízes de cevada, aveia e ervilha, foram detectadas as actividades de ATP-fosforribosil-transferase, imidazoleglicerol-fosfato-desidratase e histidinol-fosfato-fosfatase [Wiater et al. (1971)].

Encontrou-se actividade de histidinol-desidrogenase em extractos brutos de diferentes espécies vegetais [Wong et al. (1981)]. Estes resultados sugerem que a biossíntese da histidina nas plantas seguem a mesma via destes microorganismos, se bem que não tenha sido isolada qualquer proteína a partir de plantas e identificada como uma enzima envolvida directamente na biossíntese da histidina.

As vias para a biossíntese dos dez aminoácidos essenciais à dieta humana são de especial interesse como alvos para o



desenvolvimento de novos compostos inibidores que possam actuar como herbicidas. Este interesse é devido à probabilidade de um inibidor específico de qualquer uma das enzimas destas vias ser totalmente não tóxico para vertebrados, os quais não possuem as vias de biossíntese dos aminoácidos essenciais.

Foi portanto um dos principais objectivos do presente invento desenvolver um método de purificação da enzima histidinol-desidrogenase a partir de plantas.

É ainda um objectivo gerar sequências de DNA codificadoras de uma proteína apresentando actividade de histidinol-desidrogenase usando plantas como organismo fonte.

Constitui também um objectivo desenvolver um ensaio para a identificação de novos compostos inibidores que possam actuar como herbicidas.

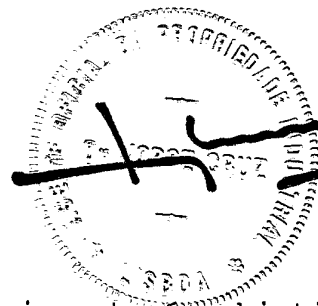
Surpreendentemente no presente invento foram atingidos estes objectivos.

Assim, o presente invento compreende um novo método de purificação de histidinol-desidrogenase a partir de plantas essencialmente até homogeneidade caracterizando-se por:

(a) exposição de um extracto de proteína a uma coluna de cromatografia de permuta iónica para produzir um primeiro eluato na presença de um gradiente linear;

(b) exposição do primeiro eluato a uma coluna de cromatografia de afinidade para produzir um segundo eluato na presença de um solvente de deslocamento adequado, em que a referida coluna de cromatografia compreende um ligando específico para a histidinol-desidrogenase;

(c) armazenamento do segundo eluato.



Um outro aspecto do presente invento é a histidinol-desidrogenase purificada, preferencialmente tendo a sequência de aminoácidos idêntica ou substancialmente homóloga à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1.

O presente invento também compreende um método para a produção de uma proteína vegetal recombinante purificada apresentando actividade de histidinol-desidrogenase compreendendo:

(a) transformação de um organismo hospedeiro adequado com um DNA recombinante compreendendo uma sequência de DNA codificadora de uma proteína com actividade de histidinol-desidrogenase;

(b) isolamento da proteína a partir do sobrenadante de expressão.

O invento também compreende um método de produção de uma sequência de DNA essencialmente pura codificadora de uma proteína apresentando actividade de histidinol-desidrogenase, método esse que se caracteriza por:

(a) preparação de uma biblioteca genómica ou de cDNA a partir de um organismo fonte adequado usando um vector de clonagem adequado;

(b) hibridação da biblioteca com uma molécula sonda;

(c) identificação de hibridações positivas da sonda com os clones de DNA da biblioteca, ou seja clones potencialmente contendo a sequência de nucleótidos correspondendo à sequência de aminoácidos da histidinol-desidrogenase.

Também está incluído um método de produção de uma sequência de DNA essencialmente pura codificadora de uma proteína apresentando actividade de histidinol-desidrogenase, método esse que compreende:



(a) preparação de DNA total a partir de uma biblioteca genômica ou de cDNA;

(b) utilização do DNA do passo (a) como um molde para reacção de PCR com iniciadores representando porções de baixa degenerescência da sequência de aminoácidos da histidinol-desidrogenase.

Está também englobado no presente invento uma proteína vegetal essencialmente pura -natural ou recombinante- apresentando actividade de histidinol-desidrogenase assim como uma sequência de cDNA codificadora da referida proteína.

O invento também compreende um cDNA codificador de histidinol-desidrogenase de plantas, o passo final na biossíntese da histidina.

Um outro aspecto do presente invento é um ensaio para identificar inibidores da actividade de histidinol-desidrogenase compreendendo:

(a) incubação de uma primeira amostra de histidinol-desidrogenase e do seu substrato;

(b) medição de uma reactividade não inibida da histidinol-desidrogenase do passo (a);

(c) incubação de uma primeira amostra de histidinol-desidrogenase e do seu substrato na presença de uma segunda amostra compreendendo um composto inibidor;

(d) medição de uma reactividade inibida da histidinol-desidrogenase do passo (c); e

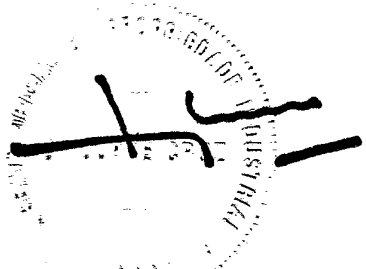
(e) comparação da reactividade inibida com a reactividade não inibida da histidinol-desidrogenase.

Um outro aspecto do presente invento é um ensaio para identificar mutantes de histidinol-desidrogenase resistentes a inibidores compreendendo:

- (a) incubação de uma primeira amostra de histidinol-desidrogenase e do seu substrato na presença de uma segunda amostra compreendendo um inibidor de histidinol-desidrogenase;
- (b) medição de uma reactividade não mutagenizada da histidinol-desidrogenase do passo (a);
- (c) incubação de uma primeira amostra de uma histidinol-desidrogenase mutagenizada e do seu substrato na presença de uma segunda amostra compreendendo um inibidor de histidinol-desidrogenase;
- (d) medição de uma reactividade mutagenizada da histidinol-desidrogenase mutagenizada do passo (c); e
- (e) comparação da reactividade mutagenizada relativamente à reactividade não mutagenizada da histidinol desidrogenase.

Outros aspectos do presente invento são inibidores assim identificados assim como composições contendo-os, os mutantes não inibidos da histidinol-desidrogenase, cultivares transgênicos contendo os mutantes não inibidos da histidinol-desidrogenase e métodos para o tratamentos de ervas daninhas utilizando a aplicação de inibidores da histidinol-desidrogenase a colheitas transgênicas contendo os mutantes não inibidos da histidinol-desidrogenase.

Para auxiliar a interpretação do significado e âmbito do presente invento, os termos que se seguem destinam-se a ter os significados descritos abaixo, a menos que de outra forma seja indicado. Todas as referências citadas neste pedido são aqui incluídas como referência devido aos seus ensinamentos relevantes.

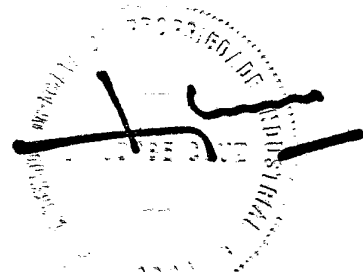


Sequência de DNA codificadora: Uma sequência de DNA que, quando transcrita e traduzida, resulta na formação de um polipeptídeo celular.

Gene: Uma região cromossômica discreta compreendendo sequências reguladoras de DNA responsáveis pelo controle de expressão, i.e., transcrição e tradução e uma sequência codificadora que é transcrita e traduzida para dar um polipeptídeo distinto.

Quantidade Inibidora Eficaz da Histidinol-Desidrogenase ou Decréscimo Significativo na Actividade de Histidinol-Desidrogenase: Um decréscimo significativo na capacidade da histidinol-desidrogenase para converter substratos tais como histidinol em produtos tais como histidina conforme medido por quantificação da actividade enzimática como é do conhecimento dos familiarizados com a matéria, incluindo constantes de equilíbrio, velocidades de reacção do aparecimento de produtos de reacção ou do consumo dos substratos de reacção, cinética de reacção, termodinâmica da reacção, análise espectrofotométrica dos produtos de reacção, detecção de componentes marcados da reacção, etc., sendo o método de medição preferido a medição espectofotométrica de NAD⁺ como um produto secundário da reacção. Um decréscimo significativo na actividade enzimática é qualquer decréscimo que seja superior à margem de erro inerente na técnica de medição, de preferência um decréscimo de 5%, mais preferencialmente um decréscimo de 90%, mais preferencialmente um decréscimo de 99% e mais preferencialmente um decréscimo para níveis essencialmente não detectáveis de actividade enzimática.

Homologia Substancial de Sequências: Equivalência substancial funcional e/ou estrutural entre sequências de nucleótidos ou de aminoácidos. Diferenças funcionais e/ou estruturais



entre sequências tendo homologia substancial de sequências serão de minimus. As sequências que diferem das sequências naturais são geralmente variantes da sequência natural. Uma variante de uma sequência natural é uma forma modificada da sequência modificada que desempenha a mesma função. A variante pode ser uma mutação ou pode ser uma sequência sintética. Uma diferença funcional de minimus resulta de um nucleótido ou sequência de aminoácidos que codifica uma proteína tendo essencialmente as mesmas características da proteína nativa. Tais características podem incluir, por exemplo, reactividade imunológica, actividade enzimática, integridade proteica estrutural, etc. Diferenças estruturais são consideradas de minimus se existe uma quantidade significativa de sobreposição de sequências ou semelhança entre duas ou mais sequências diferentes ou se as sequências diferentes apresentam propriedades físicas semelhantes. No caso da sequência de nucleótidos, as sequências diferentes terão preferencialmente pelo menos 60%, mais preferencialmente 75%, mais preferencialmente 90% ou mais de semelhança de sequências entre elas. No caso das sequências de aminoácidos, as sequências diferentes têm pelo menos 70%, mais preferencialmente 80%, mais preferencialmente 90% e ainda mais preferencialmente pelo menos 99% ou mais de semelhança entre os polipeptídeos codificados nas sequências de aminoácidos. As propriedades físicas que podem ser semelhantes incluem, por exemplo, mobilidade electroforética, semelhanças cromatográficas, coeficientes em gradientes de sedimentação, etc.

Planta Transgênica: Uma planta tendo estavelmente integrado DNA exógeno no seu material genético. São conhecidos vários métodos diferentes de introdução de DNA exógeno nos protoplastos vegetais, células vegetais ou outro material vegetal e podem ser usados para produzir os protoplastos transgênicos, células transgênicas ou plantas transgênicas do presente invento.



Erva daninha: Qualquer espécie indesejável de planta que cresça entre uma cultura de plantas tais como searas, de preferência qualquer indivíduo de uma espécie que seja heterogêneo para a espécie de uma população homogênea de plantas.

O presente invento está relacionado com métodos de purificação de uma proteína anteriormente não purificada derivada de plantas, a proteína purificada por tal método, DNA codificador de tal proteína, métodos de utilização da proteína e DNA para testar inibidores específicos da proteína e métodos de utilização de inibidores específicos para testar formas alteradas da proteína que são menos funcionais de forma a produzir uma insensibilidade aos inibidores.

O método de purificação utiliza uma coluna de cromatografia de afinidade que é específica da histidinol-desidrogenase. Podem ser empregues vários métodos conhecidos antes e depois da cromatografia de afinidade para produzir um extracto bruto para aplicar na coluna de afinidade e para caracterizar e guardar a proteína isolada através da coluna de afinidade.

Tais passos anteriores podem incluir homogenização, filtração, centrifugação, precipitação com sais de amónio, remoção de sal, cromatografia de permuta iónica, sonicação, etc. Numa realização preferida do presente invento, o tecido vegetal a partir do qual se obtém a histidinol-desidrogenase é obtido por homogenização usando por exemplo, um misturador. O homogenato é então preferencialmente passado através por filtros tais como gase. O filtrado é então preferencialmente centrifugado, de preferência a cerca de 30000 xg durante pelo menos 20 minutos.

O sobrenadante é então preferencialmente precipitado usando sulfato de amónio entre 40 e 70% da saturação, mais preferencialmente a cerca de 45% a 60% de saturação e o precipitado é colhido

e removido o sal usando uma técnica de remoção de sal adequada como seja diálise ou filtração em gel, de preferência usando filtração em gel com Sephadex G-25 com aproximadamente 50 mM TRIS/HCL a um pH entre cerca de 7 e 7,5, de preferência a pH 7,4.

O extracto de proteína sem sal pode ser então ainda preparado para cromatografia de afinidade usando uma coluna de permuta iónica adequada. Uma coluna de permuta iónica preferida é por exemplo uma resina derivatizada com Dietil-amino-etil (DEAE), tal como DEAE-celulose, mais preferencialmente DEAE-Toyopearl [uma resina de cromatografia de permuta iónica que pode ser adquirida à TOSOH, Ltd. (Tokyo)], equilibrada com um tampão adequado como seja o tampão usado no passo de remoção do sal, mais preferencialmente 50 mM TRIS/HCL a aproximadamente pH 7,4. A eluição da coluna de permuta iónica pode ser conseguida usando um gradiente linear contendo tampão de equilíbrio e um gradiente salino adequado. Um gradiente salino preferido é um gradiente de NaCl variando entre 0 mM e pelo menos 500 mM. O eluato da coluna de permuta iónica constitui então um extracto bruto adequado para aplicação na coluna de cromatografia de afinidade.

Ligandos adequados para a coluna de cromatografia são qualquer substrato específico da enzima, histidinol-desidrogenase, que se pretenda isolar. A ligação do ligando à resina da coluna ocorrerá preferencialmente numa posição no ligando que não interfirirá significativamente com a ligação do ligando à enzima a ser isolada. São ligandos preferidos para a histidinol-desidrogenase o histidinol e histidinal, mais preferencialmente histidinol. Qualquer resina adequada pode ser usada para ligar o ligando, sendo uma resina preferida a Sepharose-4B. São do conhecimento geral os métodos para a ligação de ligandos a resinas de cromatografia.

Um método preferido de preparação de uma resina para uma coluna de afinidade adequada é como se segue. Sepharose-4B é activada com epicloroidrina como descrito anteriormente [Matsumoto et al. (1979)]. Gel de Sepharose-4B epoxiactivada foi suspenso em 0,1N NaOH contendo 0,5g de glucose por g de gel e incubado a 40°C num agitador durante 24 horas [Kanamori et al. (1986)]. Após lavagem extensiva com água, o gel foi suspenso em metaperiodato de sódio previamente arrefecido e a suspensão agitada durante 1 hora a 4°C. O gel foi lavado com água, suspenso em 0,1 M HCl e incubado à temperatura ambiente durante 1 hora. Novamente o gel foi lavado extensivamente com água, seguido de lavagem com tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0 à temperatura ambiente.

O gel veículo formilado é suspenso num tampão de fosfatos, preferencialmente um tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0 contendo 100 mM de di-hidrocloreto de histidinol, o qual foi primeiro neutralizado, de preferência pela adição de NaOH e a suspensão incubada a 4°C durante a noite. Cinco miligramas de cianoboro-hidreto de sódio por g de gel foi então adicionado à suspensão e incubado com agitação à temperatura ambiente durante 6 horas. O gel foi lavado extensivamente com água destilada e tratado com 5 mg de boro-hidreto de sódio por g de gel durante 3 horas a 4°C para converter os restantes grupos formilo em grupos hidroximetilo.

Após preparação de uma resina adequada para coluna de afinidade, a resina é colocada numa coluna adequada, preferencialmente uma coluna de cerca de 2,5 x 8 cm. O extracto bruto da proteína é colocado na coluna de afinidade e preferencialmente lavado extensivamente com um tampão adequado, preferencialmente contendo uma força iónica adequada de sal, e.g. tampão 10 mM TRIS/HCl, cerca de pH 7,3, contendo cerca de 100 mM a 200 mM NaCl, de preferência cerca de 140 mM NaCl. A enzima ligada pode

ser eluída usando um solvente de deslocamento adequado. Um solvente de deslocamento adequado é um contendo uma substância que terá uma afinidade para a enzima a ser isolada que é semelhante ao ligando usado na coluna de afinidade. Quando a enzima é histidinol-desidrogenase e o ligando é histidinol, um solvente de deslocamento preferido é um que contenha imidazole, mais preferencialmente um contendo cerca de 50 mM TRIS/HCl, pH cerca de 7,3 e imidazole.

Subsequentemente à cromatografia de afinidade podem ser empregues métodos para caracterizar e guardar a proteína isolada pela cromatografia de afinidade. Estes incluem a remoção do sal do eluato da coluna de cromatografia de afinidade para um sal adequado para remover o solvente de deslocamento. A proteína sem sal pode então ser ainda caracterizada ou concentrada e guardada criogenicamente, de preferência abaixo de -50°C , mais preferencialmente a cerca de -80°C .

A proteína pode ser caracterizada usando técnicas convencionais tais como filtração em gel (massa molecular), electroforese em gel de poliacrilamida [Laemmli (1970)] (pureza e peso molecular), focagem isoeléctrica (ponto isoeléctrico), sequenciação de aminoácidos, ensaios enzimáticos adequados (para medir a actividade enzimática), etc.

A actividade enzimática é preferencialmente testada espectrofotometricamente medindo o aumento da absorvância a 340 nm devido à redução de NAD^{+} num espectrofotómetro, como seja por exemplo um Hitachi U-3120. Numa realização preferida do invento a mistura de reacção contem tampão 150 mM Gli/NaOH, pH 9,2, 0,5 mM MnCl_2 , 2 mM NAD^{+} , 5 mM histidinol e 2-5 mU de amostra de enzima num volume total de 0,5 ml. A reacção foi iniciada com a adição de histidinol e incubada preferencialmente a 30°C . Corre sempre

em paralelo uma amostra referência contendo água em lugar de histidinol. Uma unidade de enzima catalisa a formação de 25 M de NADH por minuto nas condições do ensaio.

A actividade também pode ser seguida medindo a formação de His com um analizador de aminoácidos como seja por exemplo um Hitachi L-850. A reacção enzimática pode ser terminada pela adição de ácido fórmico (concentração final 30%) à mistura de reacção. A amostra é então evaporada e o precipitado dissolvido em 0,2 N HCl. Esta preparação foi usada para análise de His, sequenciação de aminoácidos, actividade enzimática, etc.

A determinação da sequência de aminoácidos pode ser conseguida por métodos conhecidos, e.g. reacção de degradação de Edman manual ou automática usando instrumentação comercial (Applied Biosystems, Foster City, California). A sequenciação de aminoácidos pode ser conseguida em toda a proteína ou a sequenciação pode ser realizada em fragmentos ou fracções da proteína. Tais fragmentos incluem sequenciação N-terminal, sequenciação após digestão com Lis-C (Wako Pure Chemical Co., Osaka, Japan), sequenciação após digestão com brometo de cianogénio, etc.

A clivagem com brometo de cianogénio pode ser realizada in situ de acordo com Simpson e Nice (1984). A digestão com piroglutamato-aminopeptidase [Boehringer Mannheim] pode ser realizada de acordo com Allen (1981):

No decurso da digestão com LisC a proteína é preferencialmente digerida com endoproteinase Lis-C [Boehringer Mannheim] em 0,1M Tris-HCl (pH 8,5) durante um período de 24 horas à temperatura ambiente, usando uma proporção de enzima:substrato de 1:10. Os peptídeos resultantes foram isolados por meio de HPLC [por exemplo, coluna Aquapore C-8 (1 x 22 cm, Brownlee)]. Como

eluente pode ser usado um gradiente linear de acetonitrilo:isopropanol (1:1) (0% a 60%) em 0,1% TFA.

Usando a(s) sequência(s) de aminoácidos, frações da sequência de aminoácidos que apresentem degeneração mínima das sequências de nucleótidos codificadores da proteína podem ser usadas na síntese de oligonucleótidos sonda. Os oligonucleótidos sonda podem ser sintetizados por química de fosforamidatos, e.g. como realizado por um sintetizador de DNA Applied Biosystems 380B [Foster City, California] usando reagentes disponíveis no fabricante.

Exemplos de tais frações úteis da sequência de aminoácidos obtidas a partir de couve que podem ser usados para sintetizar oligonucleótidos sonda incluem:

Lis-C#17	Tre Glu Ser Fen Ala Lis
Lis-C#18	Tre Val Val Leu Ala Tre Pro Pro Tre Lis
Lis-C#32	Glu Ala Fen Asp Val Ala Tir Asp Asn Ile Tir Ala Fen His Leu Ala Gln Lis
Lis-C#45	Lis Fen Met Tre Val Gln Ser Leu Tre Glu Glu Gli Leu Arg Asn Leu Gli Pro Tir Val Ala Tre Met Ala Glu Ile Glu Gli Leu Asp Ala
Lis-C#48	Ala Leu Ser His Ser Fen Tre Val Fen Ala Arg Asp Met Ile Glu Ala Ile Tre Fen Ser Asn Leu Tur Ala Pro Glu Lis
CNBr#6	Met Ala Glu Ile Glu Gli Leu Asp Ala His Lis Arg Ala Val Tre Leu Arg ? Lis Asp Ile Glu
CnBr#18	Leu Ala Ile Pro Ala Gln Ile Ala Gli Arg Lis Tre Val Val Leu Ala Tre Pro
N-terminal	Met lis Ile Tir Arg Leu Ser Glu Leu Ser Fen ? Gln Val Glu Asn Leu Lis Ala Arg ? ? Ile Asp

em que a terminologia de aminoácidos é as abreviaturas convencionais.

Após marcação com uma marca adequada tal como P-32, estas sondas oligonucleótidas podem ser usadas no despiste de uma biblioteca de DNA, de preferência uma biblioteca de cDNA do mRNA derivado do organismo a partir do qual se obtém a histidinol-desidrogenase. Tal biblioteca (uma biblioteca de cDNA) de RNA poli A(+) do organismo fonte pode ser construída num vector de clonagem adequado, de preferência um vector de clonagem tal como lambda ZAPII (que pode ser adquirido à Stratagene, La Jolla, California usando o kit de cDNA Uni-ZAPXR, que também pode ser adquirido a Stratagene) utilizando os métodos conhecidos. A hibridação positiva dos oligonucleótidos sonda com um clone de cDNA da biblioteca identifica o clone que potencialmente contém a sequência de nucleótidos correspondente à sequência de aminoácidos da histidinol-desidrogenase.

Como alternativa, DNA total de uma biblioteca de DNA, preferencialmente de uma biblioteca de cDNA pode ser preparado e usado como molde para uma reacção de PCR com iniciadores representando segmentos de pouca degenerescência da sequência de aminoácidos. De preferência, os iniciadores usados darão origem a produtos de PCR que representam uma fracção significativa da sequência de nucleótidos. Os iniciadores preferidos que podem ser usados para fazer o despiste de DNA total da biblioteca de cDNA incluem:

EW25: 5' TTAAGAATTCTAYGAYAAAYATHHTAYGC3'

JR03: 5' CCYTCDATYTCNGCCAT3'

onde D indica qualquer uma das bases A, T ou G; H indica as bases A, T ou C; R indica as purinas A ou G; Y indica as pirimidinas T ou C. Os produtos de PCR podem ser ainda despistados para determinar se correspondem a uma fracção do gene da

histidinol-desidrogenase usando um oligonucleótido sonda sintético correspondendo a uma sequência de aminoácidos situada no interior ou no meio da proteína histidinol-desidrogenase. Um exemplo de tal sonda incluiria a sonda marcada com ^{32}P representada pela fórmula: JR02: 5'ATNGCYTCDATCATRTC3'

onde D indica qualquer uma das bases A, T ou G; H indica as bases A, T ou C; R indica as purinas A ou G; Y indica as pirimidinas T ou C.

O produto de PCR pode assim ser usado, por exemplo, para seleccionar e isolar mais clones de DNA usando técnicas convencionais [Maniatis et al. (1982)]. A sequenciação de nucleótidos do DNA de tamanho completo codificador da histidinol-desidrogenase pode ser obtido usando técnicas convencionais [Maxam e Gilbert (1977); e Sanger (1977)] ou usando instrumentação de sequenciação de nucleótidos adquirida comercialmente [adquirida à Applied Biosystems, Foster City, California e Dupont, Wilmington, Delaware].

Os clones de cDNA e os produtos de PCRpreparados como descrito atrás ou seus fragmentos pode ser usado como sonda de hibridação num processo de identificação de outras sequências de DNA a partir de um organismo fonte homólogo ou heterólogo codificador de uma proteína que apresenta actividade de histidinol-desidrogenase. Eles podem também ser usados como marcador de RFLP para determinar por exemplo a localização do gene da histidinol-desidrogenase ou de uma característica estreitamente ligada no genoma vegetal ou de cruzamento auxiliado por uma marca [EP-A 306,139; WO 89/07647].

Numa realização preferida do presente invento um cDNA de couve, a sequência da qual está apresentada em SEQ ID NO:1, foi usado como sonda de hibridação em condições restrigência baixa

para identificar dois clones de cDNA pelo menos parciais [designados SA4 e SA5] derivados de trigo codificadores de um polipeptídeo tendo actividade de histidinol-desidrogenase.

Uma vez tendo identificado e isolado o DNA codificador de um produto polipeptídico apresentando actividade de histidinol-desidrogenase pode ser obtida a partir de expressão transgénica do referido DNA, i.e. colocando um DNA recombinante compreendendo uma sequência de DNA codificadora de uma proteína tendo actividade de histidinol-desidrogenase num sistema de expressão adequado de bactéria, levedura ou de outra célula.

Hospedeiros adequados incluem bactérias tais como E. coli e levedura, incluindo a estirpe Saccharomyces cerevisiae. Outros hospedeiros de sistemas de expressão adequados incluem células de insectos crescidas em cultura. Estas células de insecto podem ser infectadas com um baculovírus contendo uma molécula de DNA recombinante de acordo com o invento.

Como alternativa, o baculovírus pode ser usado para infectar as células de um insecto vivo e as células de insecto usadas como hospedeiro do sistema de expressão. Deixa-se então que o sistema de expressão produza um sobrenadante de expressão. Isto permite a obtenção fácil de grandes quantidades de histidinol-desidrogenase recombinante purificada através do isolamento a enzima a partir do sobrenadante de expressão

Encontrou-se que a histidinol-desidrogenase de plantas é codificada como uma proenzima. No caso da histidinol-desidrogenase de couve esta proenzima compreende um peptídeo amino-terminal de 31 resíduos de aminoácidos que não está presente na enzima madura. A extensão amino-terminal da proenzima da couve tem uma

composição de sequências típica dos peptídeos de trânsito dos cloroplastos.

As extensões amino-terminais da proenzima histidinol-desidrogenase derivada de plantas tendo sido operacionalmente ligada a uma sequência de DNA homóloga ou heteróloga pode assim ser usada para direccionar as referidas sequências de DNA para o compartimento cloroplastidial da célula vegetal, como descrito por exemplo, em EP-A 189,707.

A histidinol-desidrogenase purificada pode então ser usada num ensaio para identificar inibidores da actividade de histidinol-desidrogenase, ensaio esse que compreende:

- (a) incubação de uma primeira amostra de histidinol-desidrogenase e seu substrato;
- (b) medição de uma reactividade não inibida da histidinol-desidrogenase do passo (a);
- (c) incubação de uma primeira amostra de histidinol-desidrogenase e seu substrato na presença de uma segunda amostra compreendendo um composto inibidor;
- (d) medição de uma reactividade inibida da histidinol-desidrogenase do passo (c); e
- (e) comparação da reactividade inibida com a reactividade não inibida da histidinol-desidrogenase.

Histidinol-desidrogenase adequada para o ensaio acima pode ser obtida usando os métodos de purificação do presente invento. São substratos adequados o histidinol ou análogos estruturais que são capazes de serem convertidos num análogo da histidina pela enzima histidinol-desidrogenase, sendo um substrato preferido o histidinol. De preferência, o substrato está numa concentração de aproximadamente 1 mM a cerca de 100 mM, mais

preferencialmente entre cerca de 1 mM e cerca de 10 mM, mais preferencialmente a cerca de 5 mM.

Para além da enzima histidinol-desidrogenase e de um substrato adequado, a mistura de reacção pode conter um tampão adequado, cofactores adequados e catiões divalentes adequados como cofactor. Um tampão adequado inclui qualquer tampão biológico adequado que possa fornecer capacidade tamponante a um pH que conduza às necessidades da reacção da enzima. Preferencialmente o tampão proporciona capacidade tamponante na gama de pH de 7,5 a 10,0, mais preferencialmente a um pH de aproximadamente 9,2, e.g., 150 mM Gli/NaOH (glicina/hidróxido de sódio) a pH 9,2. Um cofactor preferido para a enzima histidinol-desidrogenase é o NAD, preferencialmente numa concentração de aproximadamente 1 mM até cerca de 100 mM, mais preferencialmente a cerca de 2 mM. Preferencialmente, o catião divalente é um catião de um metal divalente, mais preferencialmente manganês. A reacção é realizada a uma temperatura adequada para permitir que a reacção decorra. Tal temperatura adequada é entre cerca de 4°C e 40°C, mais preferencialmente entre aproximadamente a temperatura ambiente e cerca de 35 °C, mais preferencialmente a cerca de 30°C. A mistura de reacção mais preferida contém tampão 150 mM Gli/NaOH, pH 9,2, 0,5 mM $MnCl_2$, 2 mM NAD⁺, 5 mM histidinol e 2-5 mU de uma amostra da enzima num volume total de 0,5 ml a 30°C. Preferencialmente, a reacção é iniciada coma adição de histidinol.

A reactividade não inibida da histidinol-desidrogenase é qualquer medição da actividade enzimática da enzima histidinol-desidrogenase enquanto na presença de um substrato adequado. Tais medições da actividade enzimática são geralmente conhecidas dos familiarizados com a matéria, incluindo constantes de equilíbrio, velocidades de reacção do aparecimento dos produtos de reacção ou do consumo dos substratos de reacção, cinética de

reacção, termodinâmica da reacção, análise espectrofotométrica dos produtos de reacção, detecção dos componentes de reacção marcados, etc. Ver, de um modo geral, Segel, Biochemical Calculations, 2ª Edição, John Wiley and Sons, New York (1976); Suelter, A Practical Guide to Enzymology, John Wiley and Sons, New York (1985). O método preferido de medição da actividade enzimática é o espectrofotométrico por medição do aumento da absorvância a 340 nm devido à redução de NAD^+ , e.g., usando por exemplo um espectrofotómetro Hitachi U-3120.

Foram identificados compostos inibidores adequados usando os métodos atrás referidos. Até à data foram identificados pelo menos sete compostos.

A reactividade inibida foi determinada do mesmo modo que a reactividade não inibida com a adição de um inibidor da histidinol-desidrogenase. A concentração do inibidor pode variar dependendo da actividade inibidora, mas de um modo geral será uma quantidade que varia entre cerca de 10 mM e cerca de 200 mM, mais preferencialmente cerca de 0,1 mM a cerca de 100 mM, mais preferencialmente cerca de 1 mM a cerca de 200 mM, mais preferencialmente cerca de 0,1 mM a cerca de 100 mM, mais preferencialmente cerca de 1 mM a cerca de 10 mM. Geralmente, o histidinolou outro substrato será adicionado a uma mistura contendo a enzima e o inibidor e então a actividade enzimática é determinada como descrito anteriormente.

A comparação da reactividade inibida com a reactividade não inibida da histidinol-desidrogenase inclui determinação de um decréscimo significativo na actividade enzimática observado na reactividade inibida comparado com a reactividade não inibida. Um decréscimo significativo é um decréscimo na actividade enzimática que é maior do que a margem de erro inerente na técnica de

medição, preferencialmente um decréscimo de cerca de 50% da actividade na ausência do inibidor, mais preferencialmente um decréscimo de cerca de 90%, mais preferencialmente um decréscimo de aproximadamente 99%, mais preferencialmente ainda um decréscimo para um nível de actividade enzimática que é essencialmente indetectável.

Uma vez identificado um composto herbicida que iniba a função da enzima tipo selvagem, matando o organismo contendo a enzima, os mutantes resistentes podem ser isolados por mutagenização de uma população do organismo em questão, crescimento da população mutagenizada na presença de uma concentração do inibidor suficiente para inibir o crescimento do organismo tipo selvagem e selecção dos indivíduos da população que são capazes de crescer mais rapidamente do que os organismos tipo selvagem.

A mutagénese in vivo pode ser por qualquer um de vários métodos, incluindo compostos químicos, e.g., metanossulfonato de etilo [Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1972); Davis et al., Advanced Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1980); Sherman et al., Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1983); e Somerville e Ogren, Em Edelman et al. (eds) Methods in Chloroplast Molecular Biology, Elsevier Biomedical Press, pp. 129-138 (1982)], mutagénese com ultravioletas [Miller (1972)], mutagénese com raio X [e.g., Hake e Freeling, (1986); e Poethig, (1988)] e irradiação gama. Como alternativa, a sequência codificadora de histidinol-desidrogenase pode ser mutagenizada in vitro por qualquer um de vários tratamentos químicos e enzimáticos [e.g., Zoller e Smith, (1983); Leung et al. (1989); e Shortle e Bolstein, (1983)]. Tais sequências mutagenizadas são reintroduzidas no organismo hospedeiro, de preferência um microorganismo e

a população contendo uma mistura de sequências mutagenizadas reintroduzidas é crescida numa concentração não tóxica do inibidor. Os indivíduos são directamente seleccionados pela sua capacidade para crescerem na presença desta quantidade tóxica de inibidor, capacidade essa que é conferida pela sequência mutagenizada introduzida.

Os indivíduos mutantes que resultam da mutagénese in vivo, tendo uma capacidade para tolerar concentrações normalmente tóxicas do inibidor, podem ser identificados e geneticamente purificados (por sementeira de forma a ter colónias isoladas várias vezes para o caso de microorganismos ou seleccionando repetidamente uma semente isolada, deixando-a crescer até à maturidade e fazendo auto-polinização no caso de uma planta). O gene codificador da ghistidinol-desidrogenase pode ser rapidamente isolado a partir do mutante por reacção em cadeia compolimerase e a sua sequência de DNA determinada e traduzida numa sequência de aminoácidos prevista. Os aminoácidos encontrados no mutante que diferem do tipo selvagem pode-se assumir que sejam responsáveis pelo fenótipo de resistência ao inibidor. Preferencialmente, a causa das alterações de aminoácidos pode ser directamente testada através da expressão da sequência mutagenizada num sistema microbiano ou vegetal e demonstrando que a introdução da sequência mutagenizada é suficiente para conferir um fenótipo de resistência a inibidor num indivíduo que de outra forma seria selvagem.

Um ensaio para identificar mutantes de histidinol-desidrogenase resistentes a inibidores compreende:

(a) incubação de uma primeira amostra de histidinol-desidrogenase e do seu substrato na presença de uma segunda amostra compreendendo um inibidor de histidinol-desidrogenase;

(b) medição de uma reactividade não mutagenizada da histidinol-desidrogenase do passo (a);

(c) incubação de uma primeira amostra de uma histidinol-desidrogenase mutagenizada e do seu substrato na presença de uma segunda amostra compreendendo um inibidor de histidinol-desidrogenase;

(d) medição de uma reactividade mutagenizada da histidinol-desidrogenase mutagenizada do passo (c); e

(e) comparação da reactividade mutagenizada relativamente à reactividade não mutagenizada da histidinol desidrogenase.

A mistura de reacção e as condições de reacção são as mesmas do ensaio para identificação de inibidores da histidinol-desidrogenase (ensaio de inibidores) com as modificações que se seguem. Primeiro, um mutante das histidinol-desidrogenase obtido como descrito atrás, é substituído numa das misturas de reacção pela histidinol-desidrogenase tipo selvagem do ensaio dos inibidores. Segundo, um inibidor da histidinol-desidrogenase tipo selvagem está presente em ambas as misturas de reacção. Terceiro, a reactividade mutagenizada (actividade da enzima na presença de inibidor e histidinol-desidrogenase mutagenizada) e a reactividade não mutagenizada (actividade enzimática na presença de inibidor e histidinol-desidrogenase tipo selvagem) são comparados para determinar se se observa um aumento significativo na actividade enzimática na reactividade mutagenizada quando comparado com a reactividade não mutagenizada. A reactividade mutagenizada é qualquer medida de actividade enzimática da enzima histidinol-desidrogenase mutagenizada enquanto na presença de um substrato adequado e do inibidor. A reactividade não mutagenizada é qualquer medida da actividade enzimática da enzima histidinol-desidrogenase tipo selvagem enquanto na presença de um substrato adequado e do inibidor. Um aumento significativo é um aumento na

actividade enzimática que é superior à margem de erro inerente à técnica de medição, de preferência um aumento é de cerca de 2 vezes a actividade da enzima tipo selvagem na presença do inibidor, mais preferencialmente um aumento de cerca de 10 vezes, mais preferencialmente ainda um aumento de cerca de 100 vezes.

Uma sequência de DNA mutagenizada codificadora de histidinol-desidrogenase que confere resistência a herbicidas pode então ser introduzida numa espécie de cultivar com interesse, permitindo que a colheita sobreviva na presença de uma concentração do herbicida que mate todas as plantas sem a forma resistente da enzima.

Para ser expressa na célula vegetal a sequência de DNA mutagenizada codificadora da histidinol-desidrogenase é preferencialmente clonada num vector adequado para transformação de plantas que preferencialmente compreende uma ou mais sequências de DNA de promotores ou reguladoras para promover a expressão da sequência de DNA codificadora na célula vegetal transformada.

Sequências de controle adequadas são as que compreendem o promotor e sequências reguladoras 5' e 3' não traduzidas que são funcionais em plantas. Estas sequências podem, independentemente, ser derivadas de qualquer fonte, como seja, por exemplo vírus, genes vegetais ou bacterianos.

Estes promotores ou sequências reguladoras podem ser constitutivos na natureza ou podem ser regulados nos seus padrões de expressão. Tal regulação pode ser temporal ou espacial e incluem promotores regulados ao longo do desenvolvimento e promotores induzíveis. Os promotores preferidos incluem promotores do vírus do mosaico da couve flor, incluindo os promotores 35S e 19S. O vírus do mosaico da couve flor (CaMV) foi

caracterizado e descrito por Hohn et al. em Current Topics in Microbiology and Immunology, 96: 194-220 e apêndices A a G (1982). Esta descrição é aqui incluída como referência. São também preferidos os promotores dos genes da nopalina-sintetase, octopina-sintetase e manopina-sintetase.

Os promotores virais e sequências não traduzidas 5'e 3' adequadas para usar são funcionais em plantas e incluem, por exemplo, vírus de plantas tais como o vírus do mosaico da couve-flor.

CaMV é um vírus de plantas invulgar por conter DNA de cadeia dupla. Pelo menos dois promotores de transcrição do CaMV são funcionais em plantas, nomeadamente o promotor 19S, que resulta na transcrição do gene VI de CaMV e o promotor 35S. O promotor 19S e o promotor 35S são os promotores preferidos de vírus de plantas para usar no presente invento.

Os promotores 19S de CaMV e as regiões 5' não traduzidas podem ser obtidas por meio de um mapa de restrição como seja o mapa descrito na Figura 4 na página 199 do artigo de Hohn et al. referido atrás, ou a partir da sequência que aparece no Apêndice C do artigo de Hohn et al.

Para isolar o promotor 19S de CaMV e, facultativamente, a região 5' adjacente não traduzida foi seleccionado um fragmento de restrição do genoma de CaMV contendo as sequências pretendidas. Um fragmento de restrição adequado que contem o promotor 19S e a região 5' não traduzida é o fragmento entre o sítio PstI começando na posição 5386 e o sítio HindIII começando na posição 5850 da Figura 4 e apêndice C do artigo de Hohn et al..

Os nucleótidos pretendidos no fragmento de restrição podem ser facultativamente removidos por métodos convencionais. Alguns métodos adequados para a eliminação dos nucleótidos indesejáveis incluem a utilização de exonucleases [Maniatis et al. (1982); páginas 135-139] tecnologia de PCR [Mullis et al. (1987); Erlich, (ed.), PCR Technology, Stockton Press New York (1989)] e mutagênese dirigida com oligonucleótidos [Zoller e Smith (1983)].

Um processo semelhante pode ser usado para se obter uma região 3' não traduzida desejável. Por exemplo, uma sequência 3' não traduzida de um gene adequado de CaMV pode ser obtido por isolamento da região entre o sítio EcoRV na posição 7342 e o sítio BglIII na posição 7643 do genoma de CaMV como descrito na Figura 4 e apêndice C do artigo de Hohn et al..

Exemplos de promotores de genes de plantas e de regiões 5' e 3' não traduzidas adequadas para usar no presente invento também incluem os do gene codificador da subunidade pequena da ribulose-bifosfato-carboxilase-oxigenase, fosfoenol-piruvatocarboxilase e proteína de ligação à clorofila a/b. Estas regiões de genes de plantas podem ser isoladas a partir de células vegetais de formas comparáveis às descritas atrás para o isolamento das correspondentes regiões do CaMV; ver Morelli et al. (1985).

Promotores adequados e regiões 5' e 3' não traduzidas dos genes bacterianos incluem os presentes na região de T-DNA dos plasmídeos de Agrobacterium. Alguns exemplos de plasmídeos de Agrobacterium adequados incluem o plasmídeo Ti de A. tumefaciens e o plasmídeo Ri de A. rhizogenes. Os promotores de Agrobacterium e as regiões não traduzidas 5' e 3' úteis no presente invento são, em particular, as presentes nos genes codificadores da octopina, manopina e nopalina-sintetases. Estas sequências podem

ser obtidas por métodos semelhantes aos descritos atrás para o isolamento de CaMV e de promotores e de promotores de plantas e de sequências não traduzidas; ver Bevan et al. (1983).

Para além de um promotor, os genes quiméricos do presente invento podem incluir preferencialmente outras sequências não traduzidas no extremo 5', designado uma sequência líder. Sequências líder adequadas incluem sequências líder de vários comprimentos isoladas a partir do gene 35S de CaMV. Pierce et al., Plant Gene Systems and their Biology, (Alan R. Liss, Inc.) pp. 301-310. As sequências líder preferidas são as isoladas a partir do gene 35S de CaMV, tendo um comprimento entre cerca 50 e cerca de 130 nucleótidos.

O DNA recombinante compreendendo a sequência de DNA da histidinol-desidrogenase mutagenizada pode ser introduzido na célula vegetal de uma série de modos que são bem conhecidos dos familiarizados com a matéria. Por exemplo, métodos de transformação de células vegetais incluem microinjecção [Crossway et al. (1986); Neuhaus (1987)], electroporação [Riggs et al. (1986)], transformação mediada por Agrobacterium (Hinchee et al. (1988)) e aceleração balística de partículas usando por exemplo sistemas disponíveis na Agracetus, Inc., Madison, Wisconsin and Dupont, Inc., Wilmington, Delaware [ver por exemplo, Sanford et al., Patente U.S. 4,945,050; e McCabe et al., (1988)]. Ver também, Weissinger et al. (1988); Sanford et al. (1987) (cebola); Christou et al. (1988) (soja); McCabe et al. (1988) (soja); Datta et al. (1990) (arroz); Klein et al. (1988) (milho); Fromm et al. (1990); Gordon-Kamm et al. (1990) (milho)].

Um método possível para a introdução de material genético em células vegetais compreende, por exemplo, colocar as células vegetais em contacto com vírus ou com Agrobacterium tendo

o DNA a ser introduzido. Isto pode ser conseguido infectando células vegetais sensíveis ou por cocultura de protoplastos derivados de células vegetais. Dentro do âmbito deste invento pode ser usado o vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) como vector para a inserção da sequência de DNA mutagenizada da histidinol-desidrogenase de acordo com o invento numa planta.

Um outro método de inserção de uma sequência de DNA codificador de histidinol-desidrogenase mutagenizada numa célula utiliza a infecção da célula vegetal com Agrobacterium tumefaciens e/ou Agrobacterium rhizogenes, a qual foi previamente transformada com a referida construção de genes. As células vegetais transgênicas foram então cultivadas em condições de cultura adequadas conhecidas dos familiarizados com a matéria de modo a formarem-se rebentos e raízes e finalmente plantas completas. Um outro método possível de transformação de material vegetal compreende a infecção mista usando Agrobacterium rhizogenes e Agrobacterium tumefaciens transformada, como descrito por Peti et al. (1986) para a transformação de cenouras.

A sequência de DNA codificadora da histidinol-desidrogenase mutagenizada de acordo com o invento pode pois ser transferida para células vegetais adequadas por exemplo por meio do plasmídeo Ti de Agrobacterium tumefaciens ou do plasmídeo Ri de Agrobacterium rhizogenes. O plasmídeo Ti ou Ri é transferido para a planta no decurso da infecção por Agrobacterium e integrado de forma estável no genoma vegetal.

Tanto os plasmídeos Ti como os plasmídeo Ri têm das regiões que são essenciais para a produção de células transformadas. Uma destas regiões, a região de DNA de transferência (T-DNA) é transferido para a planta e conduz à indução de tumores. A outra região, a região que confere virulência (vir), é essencial

apenas para a formação dos tumores não para a sua manutenção. As dimensões da região do DNA de transferência podem ser alargadas pela incorporação da sequência codificadora da histidinol-desidrogenase mutagenizada sem que a capacidade de transferência seja alterada. Através da remoção dos genes indutores de tumores e incorporação de uma marca selectiva, o plasmídeo Ti ou Ri pode ser usado como um vector para a transferência da construção de genes de acordo com o invento para uma célula vegetal adequada.

A região vir faz a transferência da região de T-DNA de Agrobacterium para o genoma da célula vegetal independentemente da região de T-DNA e da região vir estarem presentes no mesmo vector ou em vectores diferentes dentro da mesma célula de Agrobacterium. Uma região vir num cromossoma também induz a transferência do T-DNA de um vector para uma célula vegetal.

Assim para a transferência do DNA codificador de histidinol-desidrogenase para células vegetais pode ser usado um sistema em que a região vir e a região do T-DNA estejam situadas em diferentes vectores. Tal sistema é conhecido como um "sistema de vectores binário" e o vector contendo o T-DNA é pois designado um "vector binário".

Qualquer vector contendo T-DNA que pode ser transferido para células vegetais e permite selecção das células transformadas é adequado para usar dentro do âmbito deste invento, como seja por exemplo, um vector vai-vem que compreende a sequência de DNA codificador da histidinol-desidrogenase mutagenizada de acordo com o invento clonada entre a sequência delimitante esquerda (LB) e a sequência delimitante direita (RB) e que é capaz de se replicar estavelmente em E. coli e em A. tumefaciens.

Usando as novas técnicas de transformação também se tornou possível em princípio transformar espécies vegetais in vitro que não são plantas hospedeiras naturais de Agrobacterium.

Tornou-se cada vez mais evidente que as monocotilédneas podem ser também transformadas com Agrobacterium, de forma que usando novas formulações experimentais que existem agora, cereais e espécies de gramíneas são susceptíveis à transformação [Grimsley NH et al. (1987)].

Um dos métodos preferidos para a introdução de DNA numa célula vegetal por meio de Agrobacterium é a chamada transformação de discos de folhas usando Agrobacterium [Horsch et al. (1985)]. Os discos de folhas estéreis de uma planta alvo adequada são incubados com células de Agrobacterium compreendendo uma das sequências de DNA codificadoras da histidinol-desidrogenase mutagenizada de acordo com o invento e são então transferidas para um meio nutritivo adequado. São especialmente adequados e portanto preferidos dentro do âmbito deste invento os meios LS que foram solidificados pela adição de agar e enriquecidos com um ou mais reguladores do crescimento de plantas normalmente usados, especialmente os seleccionados do grupo das auxinas consistindo no ácido 2,4-diclorofenoxiacético, ácido indole-3-butírico, ácido indole-3-láctico, ácido indole-3-succínico, ácido indole-3-acético e ácido p-clorofenoxiacético e do grupo das citocininas consistindo em cinetina, 6-benziladenina, 2-isopenteniladenina e zeatina. A concentração preferida das auxinas e citocininas situa-se na gama de 0,1 mg/l a 10 mg/l.

Após incubação durante vários dias, mas preferencialmente após incubação durante 2 a 3 dias a uma temperatura entre 20°C e 40°C, preferencialmente entre 23 °C e 35°C e mais especificamente a 25°C e em luz difusa, os discos de folhas foram

transferidos para um meio adequado com a finalidade de induzir rebentos. São especialmente preferidos para a selecção dos transformantes um meio LS que não contenha auxina mas que contenha citocinina em seu lugar e ao qual foi adicionada uma substância selectiva dependente do gene marcador usado. As culturas foram mantidas na luz e depois transferidas para meio fresco em intervalos adequados, mas preferencialmente com intervalos de uma semana. Os rebentos verdes que se desenvolveram foram cortados e cultivados num meio que induz a formação de raízes nos rebentos. É especialmente preferido dentro do âmbito deste invento um meio LS que não contem auxina ou citocinina mas ao qual foi adicionada uma substância selectiva para a selecção dos transformantes.

Para além da transformação mediada por Agrobacterium, dentro do âmbito deste invento é possível usar métodos de transformação directa para a inserção das construções de genes de acordo com o invento para o material vegetal.

Métodos possíveis para a transferência directa do material genético para uma célula vegetal compreendem por exemplo, o tratamento dos protoplastos usando processos que modificam a membrana plasmática, por exemplo tratamento com polietilenoglicol, tratamento com choque térmico ou electroporação ou uma combinação de ambos os processos [Shillito et al. (1985)].

Na técnica de electroporação os protoplastos vegetais juntamente com plasmídeos que compreendem a sequência de DNA codificador da histidinol-desidrogenase mutagenizada são sujeitos a pulsos eléctricos de força de campo elevada. Isto resulta num aumento reversível na permeabilidade das biomembranas e portanto permite a inserção dos plasmídeos. Os protoplastos vegetais electroporados renovam a sua parede celular, dividem-se e formam

tecido de calo. A selecção das células vegetais transformadas pode ter lugar com a ajuda das marcas fenotípicas.

Ainda um outro método para a introdução directa de material genético nas células vegetais, que se baseia em processos puramente químicos e que permite a realização da transformação de uma forma eficaz e rápida, está descrito em Negrutiu I et al. (1987).

É também para a transformação do material vegetal a transferência dirigida de genes usando cotransformação (Schocher RJ et al. 1986).

A cotransformação é um método que se baseia na internalização simultânea e integração de várias moléculas de DNA (genes não seleccionáveis e seleccionáveis) no genoma vegetal permitindo a detecção de células que tenham sido transformadas com genes não seleccionáveis.

Outros meios para a inserção de material genético contido num vector directamente numa célula vegetal compreende a utilização de processos puramente físicos, por exemplo por microinjecção usando micropipetas muito finas que são revestidas com o DNA transformante ["Microprojectile Bombardment"; Wang Y-C et al. (1988)] ou são aceleradas através de uma solução contendo o DNA na direcção das células a serem transformadas por um impacto de pressão sendo assim finamente atomizadas numa nuvem de nevoeiro com a solução como resultado do impacto da pressão [EP-A 434 616].

O bombardeamento com microprojecteis foi avançado como uma técnica de transformação eficaz para células de plantas. Em Sanford et al. (1987) foi descrito que o bombardeamento com

microprojectéis é eficaz para libertar ácido nucleico no citoplasma das células vegetais de Allium cepa (cebola). Christou et al. (1988) descreveram a penetração em aproximadamente 0,1% a 5% das células. Christou descreveu níveis observáveis da actividade da enzima NPTII e resistência nos calos transformados até 400 mg/l de canamicina. McCabe et al. (1988) descrevem a transformação estável de Glycine max (soja) usando bombardeamento com microprojectéis. McCabe et al. descreveram ainda a recuperação de uma planta transformada R_1 a partir de uma planta quimérica R_0 .

A transformação de plantas de milho, incluindo plantas de milho de elite, por bombardeamento com microprojectéis pode ser realizado de acordo com o seguinte protocolo geral:

Plantas de milho são transformadas usando uma molécula vector adequada compreendendo os genes da histidinol-desidrogenase e preferencialmente uma marca que possa ser avaliada e/ou seleccionada. Um exemplo de tal vector adequado é um plasmídeo compreendendo uma dupla cassette do promotor/terminador 35S de CaMV contendo uma marca selectiva tal como por exemplo uma resistência a antibiótico, e.g. ampicilina ou cloranfenicol.

Neste invento é preferido o plasmídeo pCGN1761 [ver EXEMPLO 14 para a sua construção] o qual contem um duplo promotor 35S de CaMV e a região tml-3' com um sítio EcoRI entre eles contido num esqueleto de plasmídeo derivado de pUC. A cassette do sítio de processamento promotor-EcoRI-3' é delimitada por vários sítios de restrição para facilidade de remoção. O plasmídeo deriva de uma série de passos (ver abaixo) desde um plasmídeo inicial de duplo 35S, pCGN2113, que por si só deriva do pCGN164 e pCGN638. O plasmídeo pCGN2113 foi depositado na ATCC em 22 de Março de 1989 com o número de acesso 40587.

O alvo para o bombardeamento microinjectável pode ser tassel primordia, meristemas dos rebentos, embriões zigóticos ou de preferência uma cultura de milho embrionário tipo II friável. Cada um dos alvos preferencialmente contem aproximadamente 250 miligramas desta cultura semeada em filtros tais como por exemplo filtros Durapore, os quais são colocados no topo de meio adequado. Um exemplo de um meio adequado é um meio N6 de Chu et al. (1975) suplementado com 3 por cento de sucrose e 2 miligramas por litro de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, que se designa "2N63S".

Numa realização preferida do presente invento uma dose de 2X de "equivalentes" do gene GUS dos plasmídeos pCHN1761, em que o gene da histidinol-desidrogenase é colocado no vector ou os clones da histidinol-desidrogenase nele contidos e plasmídeos contendo marcas selectivas tais como resistência à fosfinotricina, resistência à higromicina, resistência à paromomicina ou marcas quantificáveis tais como glucoronidase GUS) ou luciferase são coprecipitadas em partículas de tungsténio de acordo com o método de precipitação com CaCl_2 -Espermidina de Klein et al. (1988). Cinco microlitros da preparação de DNA tungsténio é pipetado para o macroprojectil e propelado para o alvo usando uma cassette de cinzento número 1 essencialmente como descrito nas instruções de funcionamento para o sistema de bombardeamento.

Após 5 dias as células foram transferidas para filtros frescos e colocadas em meio contendo agentes de selecção numa concentração de 1 a 500 miligramas por litro dependendo do agente usado. Os filtros com as células são transferidos quase semanalmente para meio fresco contendo o agente de selecção. A concentração do agente pode ser aumentada no decurso da selecção. Após 6 semanas de selecção, apareceram colónias ao acaso nos filtros. As colónias foram isoladas do decurso de três semanas, cada uma delas sendo transferida para meio fresco contendo o agente de

selecção mas sem um filtro para um período de selecção secundário.

As culturas dos calos embrionários Tipo II empregues como alvo para a transformação via bombardeamento com microprojecteis, pode ficar estabelecida usando uma de várias fontes de transplantes. Fontes de transplantes adequadas são por exemplo embriões imaturos, tasseles imaturos, bases das folhas, meristemas apicais de raízes ou rebentos, rebentos de espigas imaturos, anteras ou microsporos e óvulos. São fontes preferidas meristemas apicais, bases das folhas, embriões imaturos e tasseles imaturos. As fontes mais preferidas são embriões imaturos e tasseles imaturos.

Os meios que são capazes de iniciar a embriogénese Tipo II são os que compreendem uma formulação de sais inorgânicos semelhante ao presente no meio de Schenk e Hildebrandt (1972), mas com um maior teor de azoto e menor proporção de iões nitrato:amónio do que o empregue por Schenk e Hildebrandt.

Em particular, os meios compreendem concentrações de microelementos semelhantes aos empregues nos meios basais de Schenk e Hildebrandt. Os meios compreendem ainda um teor total de azoto entre cerca de 40 e cerca de 80 mM; mais preferencialmente cerca de 60 mM; uma proporção de iões nitrato:amónio inferior a cerca de 4,0, mais preferencialmente cerca de 1,9; e uma concentração total de sulfato de cerca de 1,6 a cerca de 8,6 mM, mais preferencialmente entre cerca de 1,6 e cerca de 4,6 mM. Os meios incluem ainda uma fonte de carbono, preferencialmente sucrose. A sucrose está preferencialmente presente em quantidades entre cerca de 1 e cerca de 6% peso por volume, mais preferencialmente 2%. Outra fonte de nutrientes para além da sucrose está preferencialmente presente no equivalente molar das concentrações de

sucrose acima descritas. Os meios preferencialmente compreendem ainda uma auxina. A concentração da auxina é preferencialmente entre cerca de 0,1 e cerca de 10 mg/l, mais preferencialmente entre cerca de 0,5 e cerca de 1 mg/l. Os meios também incluem preferencialmente um agente de solidificação. Os agentes de solidificação preferidos incluem Agar Noble, Phytagar e Gelrite, especialmente 0,8% PhytagarTM e 0,24% GelriteTM. Utilizando esta formulação de meios é possível iniciar calos embrionários Tipo II em linhas de milho, incluindo linhas de milho elite, com uma frequência superior a 2%, preferencialmente superior a cerca de 10% e mais preferencialmente com uma frequência superior a cerca de 20%. Utilizando os meios atrás referidos é ainda possível obter uma resposta embriogénica Tipo II dentro de um período de cerca de 14 dias e regenerar plantas completas a partir de linhas de milho, incluindo linhas de milho elite, com uma frequência para além da obtida com formulações de meios conhecidos.

O calo embriogénico tipo II foi identificado pela sua morfologia. Ele foi definido como "friável e de crescimento rápido [calo] com embriões somáticos bem definidos com estruturas tipo suspensoras" [Tomes et al., 1985] ou como "friável, embriogénico" [Armstrong et al., US-P 4,761.373]. A natureza do calo embriogénico maduro Tipo II é tal que possui uma maior quantidade de células individualmente competentes para a embriogénese e regeneração, é mais fácil de manipular quando exposto a agentes selectivos nos meios de cultura, é mais susceptível como alvo para transformação e são usados como material de partida para culturas em suspensão e de protoplastos. O aparecimento visual de calos embriogénicos Tipo II está apresentado em Tomes et al. (1985) ("Tomes 2").

Assim os meios úteis para o presente invento são aqueles que induzem a formação de calos embriogénicos Tipo II,

como descrito aqui. As culturas de calos embriogênicos Tipo II são desejáveis pois são o ponto de partida para as culturas em suspensão embriogênicas e culturas de protoplastos regeneráveis. Tipicamente, a resposta Tipo II iniciada de novo é estabelecida por subcultura num meio adequado, durante esse tempo a sua friabilidade e crescimento são melhorados. O potencial de regeneração é mantido durante este processo de subcultura.

O despiste das células, tecido e plantas de milho relativamente à presença de sequências de DNA específicas é realizado por análise Southern [Southern, (1975)]. Os detalhes deste processo estão apreentados em Maniatis et al. (1983). Este despiste pode também ser realizado utilizando os processos de Reacção em Cadeia com Polimerase (PCR). Os processos de PCR estão descritos detalhadamente em Mullis et al. (1987) e Erlich, (1989). Os iniciadores específicos empregues neste invento estão descritos no EXEMPLO 10.

A transformação de células vegetais inclui separação das células transformadas das que não foram transformadas. Um método conveniente para tal preparação ou selecção é incorporar no material a ser inserido na célula transformada um gene codificador de uma marca selectiva. Como resultado apenas as células que foram transformadas com êxito conterão o gene da marca. O produto da tradução do gene da marca conferirá então uma característica fenotípica que tornará possível a selecção. Geralmente a característica fenotípica é a capacidade para sobreviver na presença de algum agente químico, como seja um antibiótico, e.g., canamicina, G418, paromomicina, etc. o qual é colocado num meio selectivo.

Alguns exemplos de genes que conferem resistência a antibióticos incluem por exemplo os codificadores da

neomicina-fosfotransferase [resistência à higromicina, van den Elzen et al., Plant Molecular Biology 5:299-392 (1985)], o gene da resistência à canamicina (NPT II) derivado de Tn5 [Bevan et al. (1983); McBride et al. (1990)], o gene PAT descrito em Thompson et al. (1987) e cloranfenicol-acetiltransferase.

Um exemplo de um gene útil como marca selectiva em cultura de tecidos para identificação de células vegetais contendo vectores manipulados por engenharia genética é um gene que codifica uma enzima produtora de um produto cromogénico. Um exemplo é o gene codificador da produção de beta-glucuronidase (GUS). Esta enzima é largamente usada e a sua preparação e utilização está descrito em Jefferson (1987).

Uma vez cultivadas as células vegetais transformadas em meio selectivo as células sobreviventes são seleccionadas para posterior estudo e manipulação. Os métodos de selecção e materiais são bem conhecidos dos familiarizados com a matéria, permitindo escolher as células sobreviventes com um elevado grau de previsão de que as células escolhidas tenham sido transformadas com êxito com DNA exógeno.

Após transformação da célula vegetal ou da planta usando, por exemplo, o plasmídeo Ti de Agrobacterium, as células vegetais ou plantas transformadas pelo plasmídeo Ti de forma a ser expressa a enzima, podem ser seleccionadas por uma marca fenotípica adequada. Estas marcas fenotípicas incluem, mas não estão limitadas a resistência a antibióticos. Outras marcas fenotípicas são conhecidas e podem ser usadas neste invento.

Todas as plantas das quais podem ser isolados protoplastos e cultivados para dar plantas completas regeneradas podem ser transformadas pelo presente invento de forma a que plantas

completas sejam recuperadas contendo a sequência de DNA codificador. Algumas plantas adequadas incluem, por exemplo, espécies dos gêneros Fragaria, Lotus, Medicago, Onobrychis, Trifolium, Trigonella, Vigna, Citrus, Linnum, Geranium, Manicot, Daucus, Arabidopsis, Brassica, Raphanus, Sinapsis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersion, Nicotiana, Solanum, Petunia, Dactylis, Majorana, Cichorium, Helianthus, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum, Nemesia, Pelargonium, Panicum, Pennisetum, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucumis, Browallia, Glycine, Lolium, Zea, Triticum, Sorghum e Datura.

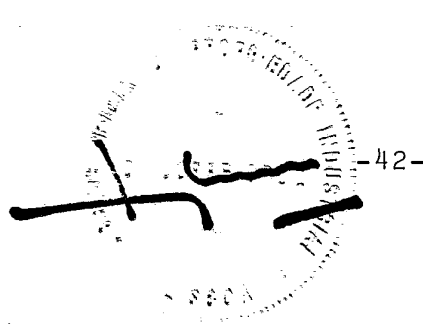
Existe cada vez mais evidência de que praticamente todas as plantas podem ser regeneradas a partir de células ou tecidos em cultura, incluindo mas não estando limitados a todas as principais espécies de cereais cultivadas, cana sacarina, beterraba açucareira, algodoeiro, árvores de fruto e outras, legumes e vegetais. Existe presentemente um conhecimento limitado



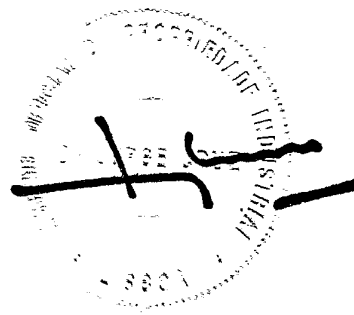
da cultura. Se estas três variáveis forem controladas, então a regeneração é totalmente reprodutível e repetível.

As plantas maduras, crescidas a partir de células vegetais transformadas são auto-cruzadas para produzir uma planta consaguínea. A planta consaguínea produz sementes contendo o gene híbrido. Estas sementes podem ser cultivadas para produzir plantas que possuem o gene híbrido. Tais plantas transformadas e sementes são conhecidas como plantas e sementes transgênicas. As plantas transgênicas preferidas são searas transgênicas, as quais são plantas adequadas para agricultura, mais preferencialmente as plantas em parte ou na sua totalidade são adequadas ao consumo por animais usados como fonte de alimentos para o homem, e.g. gado, aves de capoeira, peixe, etc.

Tais sementes transformadas podem então ser usadas para melhorar o rendimento das searas por crescimento das plantas transformadas derivadas de sementes transformadas na presença de um inibidor da histidinol-desidrogenase que será um herbicida para as plantas não transformadas que crescem entre as searas transformadas (i.e., ervas daninhas). As searas manipuladas por engenharia genética tornando-se assim resistentes a um herbicida sem toxicidade para vertebrados encorajariam a sua utilização como herbicidas seguros deste tipo como alternativa a herbicidas de um modo geral mais tóxicos de segurança questionável para o ambiente e tóxicos para vertebrados.



Os ingredientes activos do presente invento são normalmente aplicados na forma de composições juntamente com um ou mais veículos aceitáveis em agricultura e podem ser aplicados a uma seara ou planta a ser tratada, simultaneamente ou em sucessão com outros compostos. Estes compostos podem ser fertilizantes ou dadores de micronutrientes ou outras preparações que influenciem o crescimento das plantas. Eles podem ser também herbicidas selectivos, insecticidas, fungicidas, bactericidas, nematicidas, moluscicidas ou misturas de várias destas preparações, caso se pretenda com outros veículos, tensioactivos ou adjuvantes promotores da aplicação normalmente empregues nas formulações. Veículos e adjuvantes adequados podem ser sólidos ou líquidos e correspondem a substâncias normalmente empregues na tecnologia de formulações, e.g. substâncias minerais naturais ou regeneradas, solventes, dispersantes, agentes molhantes, aglomerantes ou fertilizantes.



Um método preferido da aplicação dos ingredientes activos do presente invento ou de uma composição agroquímica que contenha pelo menos um dos ingredientes activos é a aplicação foliar. O número de aplicações e a frequências das mesmas depende da intensidade da infestação pela correspondente erva daninha. No entanto, os ingredientes activos podem também penetrar na planta através das raízes através do solo (acção sistémica) por impregnação do locus da planta com uma composição líquida ou pela aplicação dos compostos na forma sólida ao solo, e.g. na forma granular (aplicação no solo). Os ingredientes activos podem ser também aplicados a sementes (revestimento) por impregnação das sementes com uma formulação líquida contendo ingredientes activos ou revestindo-os com uma formulação sólida. Em casos especiais, são também possíveis outros tipos de aplicação, por exemplo, tratamento selectivo dos caules ou botões.

Os ingredientes activos são usados na forma não modificada ou preferencialmente juntamente com os adjuvantes normalmente empregues no campo das formulações e são portanto formulados de forma conhecida em concentrados emulsionáveis, pastas revetíveis, soluções directamente vaporizáveis ou diluíveis, pós molháveis, pós solúveis, poeiras, granulados e também

encapsulações, por exemplo, em substâncias poliméricas. Tal como a natureza das composições, os métodos de aplicação, tais como vaporização, atomização, empoeiramento, dispersão ou rega, são escolhido de acordo com os objectivos pretendidos e circunstâncias prevaletentes. Taxas de aplicação vantajosas são normalmente entre 50 g e 5 Kg de ingrediente activo (a.i.) por hectare ("ha", aproximadamente 2,471 acres), de preferência entre 100 g e 2 Kg a.i./ha, mais preferencialmente entre 200 g e 500 g a.i./ha.

As formulações, composições ou preparações contendo os ingredientes activos e, sempre que apropriado, um adjuvante sólido ou líquido, são preparados de forma conhecida, por exemplo misturando homogeneamente e/ou triturando os ingredientes activos com agentes de enchimento, por exemplo solventes, veículos sólidos e sempre que adequado, compostos tensioactivos.

Solventes adequados incluem hidrocarbonetos aromáticos, preferencialmente as fracções tendo 8 a 12 átomos de carbono, por exemplo, misturas de xileno ou naftalenos substituídos, ftalatos tais como ftalato de dibutilo ou ftalato de dioctilo, hidrocarbonetos alifáticos tais como ciclo-hexano ou parafinas, alcoóis e glicóis e seus éteres e ésteres, tais como etanol, etilenoglicol monometilado ou éter de monoetilo, cetonas tais como ciclo-hexanona, solventes fortemente polares tais como N-metil-2-pirrolidona, dimetilsulfóxido ou dimetilformamida, assim como óleos vegetais epoxidados tais como óleo de coco epoxidado ou óleo de soja; ou água.

Os veículos sólidos usados e.g. para poeiras e pós dispersáveis, são normalmente agentes de enchimento naturais tais como calcite, talco, caulino, montemorilonite ou atapulgite. Para melhorar as propriedades físicas é também possível adicionar ácido silícico altamente disperso ou polímeros absorventes

altamente dispersos. Veículos adsortivos granulados adequados são do tipo poroso, por exemplo pumice, tijolo partido, sepiolite ou bentonite; e veículos não adsorventes adequados são materiais tais como calcite ou areia. Ainda, pode ser usado um grande número de materiais pré-granulados de natureza orgânica ou inorgânica, e.g. especialmente dolomite ou resíduos de plantas pulverizados.

Dependendo da natureza do ingrediente activo a ser usado na formulação, compostos tensioactivos adequados são não iónicos, catiónicos e/ou tensioactivos aniónicos tendendo a propriedades emulsionantes, dispersantes e molhantes. O termo "tensioactivos" será também entendido como englobando misturas de tensioactivos.

Tensioactivos aniónicos adequados podem ser sabões solúveis em água e compostos tensioactivos sintéticos solúveis em água.

São sabões adequados os sais de metais alcalinos, sais de metais alcalinos terrosos ou sais de amónio não substituídos ou substituídos de ácidos gordos superiores (cadeias de 10 a 22 átomos de carbono), por exemplo os sais de sódio ou potássio do ácido esteárico ou oleico ou de misturas de ácidos gordos naturais as quais podem ser obtidas por exemplo a partir de óleo de coco ou de sebo. Os sais de ácidos gordos de metiltaurino também podem ser usados.

Mais frequentemente, no entanto, são usados os chamados tensioactivos sintéticos, especialmente sulfonatos gordos, derivados de benzimidazole sulfonados ou alquilarilsulfonatos.



Os sulfonatos ou sulfatos gordos estão geralmente na forma de sais de metais alcalinos, sais de metais alcalinos terrosos ou sais de amônio não substituídos ou substituídos e têm um radical alquilo de 8 a 22 carbonos o qual também inclui a fracção alquilo dos radicais alquilo, por exemplo, o sal de sódio ou cálcio do ácido linhossulfônico, de dodecilsulfato ou de uma mistura de sulfatos de alcóis gordos obtidos a partir de ácidos gordos naturais. Estes compostos também compreendem os sais de ésteres de ácido sulfúrico e ácidos sulfônicos de aditivos álcool gordo/óxido de etileno. Os derivados sulfonados de benzimidazole preferencialmente contêm 2 grupos de ácido sulfônico e um radical de ácido gordo contendo 8 a 22 átomos de carbono. Exemplos de alquilarilsulfonatos são os sais de sódio, cálcio ou trietanolamina do ácido dodecilbenzenossulfônico, ácido dibutilnaftalenossulfônico ou de um produto de condensação do ácido naftalenossulfônico/formaldeído. São também adequados os correspondentes fosfatos, eg. sais do éster de ácido fosfórico de um aditivo de p-nonilfenol com 4 a 14 moles de óxido de etileno.

Os tensioactivos não iónicos são preferencialmente derivados ésteres de poliglicóis de alcoóis alifáticos ou cicloalifáticos ou ácidos gordos saturados ou insaturados e alquilfenóis, os referidos derivados contendo 3 a 30 grupos éter de glicol e 8 a 20 átomos de carbono na fracção hidrocarboneto (alifática) e 6 a 18 átomos de carbono na fracção alquilo dos alquilfenóis.

Outros tensioactivos não iónicos adequados são os aditivos solúveis em água de óxido de polietileno com polipropilenoglicol, etilenodiaminapropilenoglicol e alquilpolipropilenoglicol contendo 1 a 10 átomos de carbono na cadeia alquilo, aditivos esses que contem 20 a 250 grupos éter de etilenoglicol e 10 a 100 grupos éter de propilenoglicol. Estes compostos geralmente contêm 1 a 5 unidades de etilenoglicol por unidade de propilenoglicol.

São exemplos representativos de tensioactivos não iônicos os nonilfenolpolietoxietanóis, éteres de poliglicóis de óleo de castor, aditivos polipropileno/óxido de polietileno, tributilfenoxipolietoxietanol, polietilenoglicol e octilfenoxietoxietanol. Ésteres de ácidos gordos de polioxietilenossorbitano e trioleato de polioxietilenossorbitano são também tensioactivos não iônicos adequados.

Os tensioactivos catiónicos são preferencialmente sais de amónio quartenários os quais têm como N-substituinte, pelo menos um radical alquilo C_8-C_{22} e ainda como outros substituintes, radicais alquilo inferior não substituído ou halogenado, benzilo ou hidroxialquilo. Os sais são preferencialmente na forma de haletos, metilsulfatos ou etilsulfatos, e.g. cloreto de esteariltrimetilamónio ou brometo de benzildi(2-cloroetil)etilamónio.

Os tensioactivos normalmente empregues em formulações estão descritos, por exemplo, em "McCutcheon's Detergents and Emulsifiers Annual", MC Publishing Corp. Ringwood, New Jersey, 1979 e Sisely and Wood, "Encyclopedia of Surface Active Agents, "Chemical Publishing Co., Inc. New York, 1980.

As composições agroquímicas geralmente contêm entre cerca de 0,1 e cerca de 99%, de preferência entre cerca de 0,1% e cerca de 95% e mais preferencialmente entre cerca de 3 e cerca de 90%, e mais preferencialmente entre cerca de 5 e cerca de 95% de um adjuvante sólido ou líquido e entre cerca de 0 e cerca de 25%, de preferência entre cerca de 0,1 e cerca de 25% e mais preferencialmente entre cerca de 0,1 e cerca de 20% de um tensioactivo.

Se bem que os produtos comerciais sejam preferencialmente formulados como concentrados o utilizador final empregará normalmente formulações diluídas.

Segue-se uma breve descrição das Figuras, às quais é feita referência na descrição e nos EXEMPLOS.

Figura 1: Cromatografia de afinidade em Histidinol-Sephrose-4B. (-----) Concentração proteica representada pela absorção a 280 nm; (o-o-o-) actividade de histidinol-desidrogenase expressa em U/ml. A coluna de afinidade foi lavada com tampão 10 mM Tris/HCl, pH 7,3 contendo 140 mM NaCl até a proteína não adsorvida ser eluída (na fracção Nº 75). A seta na fracção Nº 76 indica o início da eluição com tampão 50 mM Tris/HCl, pH 7,3 contendo 700 mM imidazole.

Figura 2: Dependência da actividade de histidinol-desidrogenase relativamente ao pH. (■) reacção em tampão HEPES 50 mM; (O) reacção em tampão 50 mM Gli/NaOH; (□) reacção em tampão CHES 50 mM. Em todos os tampões foi incluído 0,5 mM $MnCl_2$. A reacção foi realizada em condições convencionais como descrito em Materiais e Métodos. Não foi detectada actividade em tampão fosfato 50 mM, pH 7,5.

SEQ ID NO: 1: A sequência de aminoácidos de nucleótidos da histidinol-desidrogenase da couve. Os aminoácidos estão representados pelas designações de três letras, os nucleótidos estão representados pelas designações com letras convencionais onde A é adenina, T é timidina, C é citosina, G é guanina, H é seleccionado entre timidina ou citosina e Y é seleccionado entre adenina, timidina e citosina.



SEQ ID NO: 2/3: A sequência de nucleótidos da histidinol-desidrogenase do trigo. Os nucleótidos estão representados pelas designações com letras convencionais onde A é adenina, T é timidina, C é citosina e Y é seleccionado entre adenina, timidina e citosina.

EXEMPLOS

Os exemplos que se seguem pretendem exemplificar realizações específicas do presente invento sem limitar de forma alguma o seu âmbito.

EXEMPLO 1: Materiais e Estirpes

Sepharose-4B foi adquirida à Pharmacia LKB. Di-hidrocloreto de histidinol foi comprado à Aldrich (Milwaukee, Wisconsin) e NAD^+ , metaperiodato de sódio, epicloro-hidrina e "nitroblue tetrazolium" são da Sigma (St. Louis, Missouri). O cianoboro-hidreto de sódio foi adquirido à Nakarai e fenazinametossulfato à Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan). O meio de cultura de células de insecto de Grace, soro fetal bovino, Yeastolate e hidrolisado de lactalbumina foram adquiridos à Difco Laboratories. O sulfato de gentamicina foi da Sigma. Todos os outros químicos usados foram de grau analítico.

Couve (Brassica oleracea), pepineiro (Cucumis sativa), espargo (Asparagus officinalis), beringela (Solanum melongena), alface (Lactuca sativa) e pimento (Capsicum annum) foram cultivados numa câmara de crescimento com 16h/8h de ciclo luz/escuro a 25°C durante o período de iluminação e 15°C durante o período escuro. A humidade relativa é constante a 80%. As culturas celulares de Rosa "Paul's Scarlet" foram cultivadas em suspensão como anteriormente descrito por Strauss et al. (1985). As

culturas celulares de tabaco (Nicotiana tabacum L. cv Samsun NN) e culturas em suspensão de trigo (Triticum aestivum var Chines Spring) foram cultivadas como descrito por Kumpaisal et al. (1987); e Yamada e Sato, (1978). Couve da primavera madura (Brassica oleracea L. var caoitata L.) foi adquirida a um merceiro local. O germén de trigo foi adquirido à Sigma (St. Louis, Missouri).

No entanto, deve-se dizer que para além das das culturas de células e de suspensões especificamente designadas no parágrafo anterior, qualquer outro material cultivado adequado pode ser igualmente usado como material de partida para a preparação de extractos enzimáticos.

As células de Spodoptera frugiperda (Sf9) podem ser adquiridas na American Type Culture Collection (ATCC) em Rockville, Maryland, USA com o número de acesso CRL1711. As linhas celulares alternativas que podem ser também usadas no processo de acordo com o invento compreende as de Spodoptera frugiperda tal como Sf21, a partir de Mamestra brassicae e similares.

Um kit compreendendo uma combinação de vírus da poliedrose nuclear de Autographa californica tipo selvagem (AcNPV, baculovírus) e os vectores de transferência de baculovírus pAC700, pAC701, pAC702, pVL1392 e pVL1393 podem ser comprados à Invitrogen.

As células Sf9 foram mantidas em meio de Grace suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 0,33% (p/v) de Yeastolate, 0,33% (p/v) de hidrolisado de lactalbumina e 50 µg/ml de sulfato de gentamicina a 27°C.

EXEMPLO 2: Preparação de Extracto Enzimático

Plantas com duas semanas de idade, cabeças de couve completas ou tecidos celulares bem crescidos foram usados como fontes de enzimas. O material vegetal foi homogenizado com um misturador Polytron em tampão fosfato de sódio 100 mM frio, pH 7,2 (tampão A) e o homogenato foi passado através de uma gase. Após centrifugação a 30000 xg durante 20 minutos, o sobrenadante foi fraccionado com 45-60% de saturação de sulfato de amónio em gelo. O precipitado foi colhido por centrifugação, dissolvido em tampão A e removido o sal da solução em Sephadex G-25. Este extracto enriquecido em proteína foi usado na determinação da actividade de histidinol-desidrogenase em várias plantas.

EXEMPLO 3: Purificação da histidinol-desidrogenase

Cabeças de couve primavera foram homogenizadas usando um misturador de cozinha e a suspensão processada como descrito atrás, excepto a remoção do sal ser realizada por diálise extensiva contra tampão 50 mM Tris/HCl, pH 7,4 (tampão B). Todos os processos subsequentes foram realizados a 4°C.

O extracto de proteína dialisado foi aplicado numa coluna de DEAE-Toyopearl [TOSOH Ltd (Tokyo)] equilibrada com tampão B. Após lavagem da coluna com tampão B, a proteína foi eluída com um gradiente linear de tampão B contendo cloreto de sódio (0-500 mM). A fracção proteica com actividade foi eluída da coluna de DEAE-Toyopearl antes do pico principal de proteína, a uma concentração de 150 mM cloreto de sódio no tampão.

As fracções contendo actividade enzimática foram reunidas e aplicadas directamente numa coluna de histidinol-Sepharose-4B (2,5 x 8 cm) (EXEMPLO 7) a um fluxo de 36 ml/h. A

proteína não adsorvida foi eluída por lavagem extensiva com tampão 10 mM Tris/HCl, pH 7,3 contendo 140 mM NaCl (tampão C). A histidinol-desidrogenase ligada foi eluída com 50 mM Tris/HCl, pH 7,3 contendo imidazole.

Foram feitas várias tentativas sem êxito para purificar histidinol desidrogenase a partir de cabeças de couve maduras por métodos de purificação convencionais. O desenvolvimento do gel de afinidade, altamente específico para esta enzima tornou finalmente possível purificar a proteína em três passos com elevado rendimento e aparente homogeneidade (Tabela I). Toda a actividade fica ligada ao gel, provavelmente muito fortemente, uma vez que apenas 40% da actividade foi eluída especificamente com um passo de adição de uma concentração alta de imidazole (700 mM) no tampão de eluição (Fig. 1). Apenas com este passo, a actividade enzimática específica foi aumentada por um factor de 350 a 10,16 U/mg de proteína, mostrando ser esta cromatografia muito específica da histidinol-desidrogenase. A purificação global de 2116 vezes não inclui o primeiro passo da precipitação fraccionada com sulfato de amónio, uma vez que não foi detectada qualquer actividade no extracto bruto. Um gel de SDS-poliacrilamida com uma grande quantidade de amostra aplicada mostrou apenas uma banda principal.

Após remoção do sal de todas as fracções em Sephadex G-25, a actividade enzimática em cada uma das fracções foi determinada. As fracções activas foram reunidas e concentradas numa membrana de ultrafiltração Amicon (YM-10). Esta preparação de enzima foi guardada a -80°C e usada para todas as experiências excepto a detecção de actividade em plantas.

O armazenamento da enzima durante mais de 4 meses a -80°C não alterou significativamente a actividade. A 4°C a enzima

perde 10% da sua actividade durante uma semana. Pela adição de glicerol para uma concentração final de 20% conseguiu-se manter a actividade total a 4°C durante mais de uma semana.

TABELA I:

Purificação da histidinol-desidrogenase. Nesta purificação típica foram processados 10 Kg de cabeças de couve. Todas as actividades foram medidas após remoção do sal com Sephadex G-25 ou diálise. A actividade no extracto bruto não foi detectada (n.d.).

Passo de Purificação	Proteína	Actividade	Activ.	Activ.	Pureza
	Total [mg]	Total [U]	recuperada [%]	Especif. [U/mg]	[-fold]
Extracto bruto	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fracçãoamento com sulfato de amónio	4750	23	100	0.0048	1
Cromatografia de permuta iónica em DEAE-Toyopearl	560	20.1	87	0.029	6
Cromatografia de afinidade em histidinol-Sepharose ^{4B}	0.75	7.6	33	10.16	2116

EXEMPLO 4: Filtração em Gel

Uma coluna de Sepharose 12 (Pharmacia LKB, Piscataway, New Jersey) foi equilibrada com tampão C de purificação [ver EXEMPLO 3] à temperatura ambiente. Amostras de enzima purificada foram aplicadas na coluna e eluídas com tampão C a um fluxo de 0,5 ml/min. A massa molecular foi calculada usando um kit de marcadores de peso molecular (Sigma, St. Louis, Missouri). O peso molecular da enzima nativa foi determinado por filtração em gel Superose 12 [um meio de filtração em gel analítico da LKB Pharmacia, Piscataway, NJ, USA] como sendo 103000.

EXEMPLO 5: Electroforese em Gel de Poliacrilamida

A electroforese em gel de SDS-poliacrilamida foi realizada como descrito algures Laemmli (1970)] usando 10-12% de acrilamida. As proteínas no tampão de amostra [Tris-HCl (pH 6,8) 310 mM; SDS 1%; glicerol 5%; beta-mercaptoetanol 2,5%; EDTA 1,24 mM; azul de bromofenol 0,0005%] foram colocadas a 100°C durante 10 minutos. Para o cálculo do peso molecular da proteína desnaturada e reduzida, usou-se um kit de calibração para determinação de pesos moleculares [Pharmacia, Piscataway, New Jersey]. Em condições desnaturantes e de redução, a enzima migrou como uma só banda de 52 KDaltons quando sujeita a electroforese em gel de SDS-poliacrilamida, sugerindo uma estrutura quaternária dimérica para a enzima.

O peso molecular de 103000 para a enzima da couve nativa é consideravelmente superior ao da enzima de S. typhimurium [82000, Burger et al. (1979)]; e 90000 [Eccleston et al. (1979)]. As enzimas da couve e de S. typhimurium são cada uma delas compostas por duas subunidades com um peso molecular

semelhante de 52000 e 43000 [Burger et al. (1979)], respectivamente. No entanto, o peso molecular das subunidades da enzima trifuncional de S. cerevisiae foi calculado a partir da sequência de nucleótidos como sendo 87935 [Donahue et al. (1982)] e calculado em géis de SDS como sendo de cerca de 95000 [Keesey et al. (1979)]. De acordo com estes resultados, as enzimas de levedura, S. typhimurium e couve diferem significativamente nos seus pesos moleculares.

EXEMPLO 6: Focagem Isoeléctrica

PhastGel (Pharmacia LKB, Piscataway, New Jersey) com uma gama de pH de 4-6,5 foi usado na focagem isoelectrica, realizada num Phast System (Pharmacia LKB, Piscataway, New Jersey) de acordo com as instruções do manual do fabricante. O ponto isoelectrico da proteína foi determinado usando um kit de calibração de pontos isoelectricos (Pharmacia LKB, Piscataway, New Jersey).

A exposição da enzima purificada a focagem isoelectrica analítica conduziu à sua separação em seis bandas proteicas com uma gama de pH de 5,1-5,4. Cinco bandas apresentaram actividade de histidinol-desidrogenase usando coloração da actividade. A sexta banda tinha apenas uma actividade muito ligeira ou não tinha actividade. Em experiências testemunha sem histidinol ou sem NAD^+ na mistura de reacção, "p-nitro blue tetrazolium" não é reduzido para dar "formazan". A actividade de cada uma das cinco bandas está correlacionada com as suas intensidades de cor obtidas por coloração de proteína.

Para excluir artefactos do processo de purificação, realizaram-se várias purificações independentes, partindo de



cabeças de couve em diferentes fases de crescimento. Em todos os casos obtiveram-se seis bandas de proteína.

EXEMPLO 7: Preparação do Gel Histidinol-Sepharose-4B

Sepharose-4B foi activada com epicloroidrina como anteriormente descrito [Matsumoto et al. (1979)]. Gel de Sepharose-4B epoxiactivado foi suspenso em 0,1N NaOH contendo 0,5 g de glucose por g de gel e incubou-se a 40°C num agitador durante 24 horas [Kanamori et al. (1986)]. Após lavagem extensiva com água, o gel foi suspenso em metaperiodato de sódio previamente arrefecido e a suspensão agitada durante 1 hora a 4°C. O gel foi lavado com água, suspenso em 0,1M HCl e incubado à temperatura ambiente durante 1 hora. Novamente, o gel foi lavado extensivamente com água, seguido de lavagem abundante com tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0 à temperatura ambiente.

O gel com veículo formilado foi suspenso em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0 contendo 100 mM de di-hidrocloreto de histidinol, o qual foi previamente neutralizado com NaOH e a suspensão foi incubada a 4°C durante a noite. Adicionou-se então cinco miligramas de cianoboro-hidreto de sódio por g de gel foi então adicionado à suspensão e incubado com agitação à temperatura ambiente durante 6 horas. O gel foi lavado extensivamente com água destilada e tratado com 5 mg de boro-hidreto de sódio por g de gel durante 3 horas a 4°C para converter os restantes grupos formilo em grupos hidroximetilo.

EXEMPLO 8: Ensaio Enzimático

A actividade enzimática foi ensaiada espectrofotometricamente medindo o aumento na absorvância a 340 nm devido à redução de NAD^+ num espectrofotómetro Hitachi U-3120.

A mistura de reacção continha tampão 150 mM Glic/NaOH, pH 9,2, 0,5 mM MnCl_2 , 2 mM NAD^+ , 5 mM histidinol e 2-5 mU de amostra de enzima num volume total de 0,5 ml. A reacção foi iniciada com a adição de histidinol e incubada a 30°C. A amostra de referência contendo água em vez de histidinol foi sempre processada em paralelo. Uma unidade de enzima catalisa a formação de 25M de NADH por min nas condições do ensaio.

Nalgumas experiências a actividade foi também seguida medindo a formação de His com um analisador de aminoácidos Hitachi L-850. A reacção enzimática foi terminada com ácido fórmico (concentração final 30%). A amostra foi então evaporada e o precipitado dissolvido em 0,2 N HCl. Esta preparação foi usada para análise de His.

A distribuição de histidinol-desidrogenase em onze espécies de plantas ou preparações foi examinada por actividade de histidinol-desidrogenase. A actividade da enzima não foi detectada em qualquer um dos extractos brutos derivados de várias espécies de monocotiledóneas e dicotiledóneas (Tabela I). As células de rosa em cultura e de couve primavera apresentaram as actividades específicas mais elevadas. O germén de trigo tinha uma actividade extraível extremamente alta provavelmente devido ao seu baixo teor em água, no entanto, a sua actividade específica é modesta. Também os rebentos de couve e de pepineiro e cabeças de couve primavera continham uma actividade extraível elevada. Não foi detectada actividade em rebentos de pimento de 2 semanas de idade e nas células de tabaco em cultura.

A histidinol-desidrogenase em microorganismos catalisa as duas últimas reacções para formar o produto final His. Para verificar este papel catalítico para a proteína isolada a partir de couve, a sua reacção catalisada foi analisada

estequiometricamente relativamente à formação de His e redução de NAD^+ . A quantidade de NADH produzido enzimaticamente foi determinada a partir da absorvância a 340 nm usando o coeficiente de absorvância de 6220. O outro produto formado foi identificado pela análise de aminoácidos como sendo His. His autêntica adicionada à amostra que reagiu foi co-eluída com His formada enzimaticamente. Nem His nem NADH são formados na ausência de NAD^+ , histidinol ou usando enzima desnaturada pelo calor. Formaram-se duas moles de NADH por 0,99 moles de His após um tempo de reacção de 2 min. (Tabela III). A formação de ambos os produtos histidina e NADH é dependente do tempo e estão correlacionados.

O pH óptimo para a actividade foi de 9,2 em tampão 50 mM Gli/NaOH ou em tampão HEPES 50 mM. A pH 9,2-10, praticamente toda a actividade é mantida, mas acima de 10, deu-se uma perda rápida da actividade.

Os valores de K_m aparentes da enzima para L-histidinol e NAD^+ foram determinadas em condições de ensaio normalizadas tais como 15,5 e 42 μM , respectivamente.

A influência dos iões metálicos divalentes na reacção enzimática está apresentado na Tabela IV. A reacção foi estimulada em 26% pela adição de Mn^{2+} comparado com as condições testemunha sem a adição de qualquer ião metálico divalente ao tampão de reacção (150 mM Gli/NaOH, pH 9,2). A adição de Ba^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} causou inibição da reacção.

A histidinol-desidrogenase da couve é a primeira enzima da biossíntese da His que foi purificada até à homogeneidade a partir de plantas superiores. Através da utilização de uma nova cromatografia de afinidade, foi possível a purificação desta enzima e o seu estudo. Evidência directa de que a proteína

purificada é histidinol-desidrogenase foi obtida a partir da coloração da actividade no gel após focagem isoeléctrica. O produto formado enzimaticamente partindo de histidinol foi identificado como His. His e NADH foram produzidos estequiometricamente, apresentando a mesma redução de 2 moles de NAD^+ por 1 mole de His formada como anteriormente descrito para esta reacção em microorganismos [Adams (1955)]. Os presentes resultados demonstram que pelo menos dois passos de reacção na via de biossíntese da His na couve são idênticos aos dos microorganismos e são catalisados pela mesma enzima. O K_m desta enzima para L-histidinol ($15,5 \mu\text{M}$ a pH 9,2) é muito semelhante (16 e $8,8 \mu\text{M}$) aos das enzimas purificadas a partir de S. typhimurium [Burger et al. (1981)] e a parcialmente purificada a partir de germén de trigo [Wong e Mazelis (1981)]. O K_m ($42 \mu\text{M}$) para o NAD^+ é consideravelmente mais baixo do que os das enzimas derivadas de S. typhimurium (1 mM) (24) e a partir de de germén de trigo ($140 \mu\text{M}$, usando enzima parcialmente purificada [Wong e Mazelis (1981)]). O pH óptimo da reacção está entre pH 9,2 e 9,4 é idêntico ao da histidinol-desidrogenase de outros organismos. Nenhum outro ião metálico divalente para além do Mn^{2+} apresentou estimulação da actividade enzimática. Isto está de acordo com os resultados obtidos com a enzima derivada de S. typhimurium cuja reacção catalisada é também estimulada na presença de Mn^+ [Grubmeyer et al. (1989)].

TABELA II:

Distribuição da Histidinol-desidrogenase em diferentes espécies de plantas e preparações. Para o cálculo da actividade extraível, usa-se o peso molhado do material. O peso das células das culturas submersas foi determinado após colheita por filtração com uma gase.

*) mU/mg: unidades de actividade por mg de proteína;

**) mU/g: unidades de actividade por g de material vegetal.

TABELA II

Fonte vegetal	Actividade Específica mU/mg*)	Actividade Extraível mU/mg**)
Rebentos de couve (<u>Brassica oleracea</u> L. var. <u>capitata</u> L.)	1,6	3,3
Rebentos de espargos (<u>Asparagus officinalis</u>)	0,9	1,6
Rebentos de alface (<u>Lactuca sativa</u>)	0,4	0,3
Rebentos de beringela (<u>Solanum melongena</u>)	0,4	0,9
Rebentos de pepineiro (<u>Cucumis sativus</u>)	0,3	3,3
Rebentos de pimento (<u>Capsicum annum</u>)	0	0
Couve primavera (<u>Brassica oleracea</u> L. var. <u>capitata</u> L.)	6,1	2,8
Germén de trigo	2,1	91
Cultura de células de trigo (<u>Triticum aestivum</u> var Chinese Spring)	0,5	0,4
Cultura de células de rosa (<u>Rosa</u> "Paul's Scarlet")	6,2	0,9
Cultura de células do tabaco (<u>Nicotiana tabacum</u>) L. cv Samsun (NN)	0	0

TABELA III:

Estequiometria da reacção da histidinol-desidrogenase relativamente à formação de His e de NAD^+ . A reacção enzimática foi parada após 2, 5 e 30 minutos de tempo de reacção e a amostra analisada por análise de aminoácidos (a 50 nM).

TABELA III

Tempo de reacção min	Concentração de His $\mu\text{mole/ml}$ (a)	Concentração de NADA $\mu\text{mole/ml}$ (b)	b/a
0	0	0	-
2	17,6	35,6	2,02
5	36,6	80,0	2,18
30	143,7	316,0	2,2

TABELA IV:

Efeito de iões metálicos divalentes na actividade de histidinol-desidrogenase. A concentração do ião metálico é de 0,5 mM. A actividade foi determinada após 3 min de tempo de reacção, enquanto que a velocidade ainda é constante.

TABELA IV

<u>Adição</u>	<u>Actividade relativa %</u>
Nenhuma	100
Mn ²⁺	126
Ba ²⁺	65
Mg ²⁺	54
Ni ²⁺	46
Ca ²⁺	36
Zn ²⁺	34
Cu ²⁺	24

EXEMPLO 9: Coloração da actividade

As proteínas de calibração do ponto isoeléctrico e enzima purificada (em quadruplicado) foram aplicadas num PhastGel (gama de pH 4-6,5) para dar cinco calhas. Após migração da focagem isoeléctrica o gel foi cortado em quatro pedaços. O que contem as proteínas dos marcadores para além da coloração para a enzima foi corado com Coomassie Brilliant Blue R250. Um outro pedaço de gel contendo apenas enzima foi sujeito à coloração



específica da actividade como descrito algures [Skyring et al. (1970)] com uma ligeira modificação. O gel foi imerso em 10 ml de mistura de reacção contendo 5 mM histidinol e 2 mM NAD^+ . Pela adição de 150 μl de "nitroblue tetrazolium" e 150 μl de meto-sulfato de fenazina para dar uma concentração final de 0,5 mM e 0,13 mM, respectivamente, foi iniciado o processo de coloração. A incubação foi realizada a 30°C durante 30 minutos. Dois outros pedaços de gel contendo apenas enzima foram incubados de modo idêntico mas sem histidinol ou sem NAD^+ .

EXEMPLO 10: Determinação da proteína

A concentração de proteína foi determinada pelo ensaio de proteína de Bradford usando albumina sérica bovina como padrão [Bradford (1976)].

EXEMPLO 11: Sequenciação de Aminoácidos

Aproximadamente 50 μg de histidinol-desidrogenase foi seco e ressuspenso em 0,1% de ácido trifluoroacético e sujeito directamente a degradação automática de Edman com um sequenciador de proteínas de fases gasosa-líquida Applied Biosystems 477A [Strickler et al. (1984)]. Os derivados de aminoácidos com feniltio-hindantoína (PTH) são separados e identificados com um analisador de PTH (Applied Biosystems, Foster City, California) com uma coluna PTH- C_{18} .

A primeira corrida da sequência mostrou uma recuperação de 15% da concentração de proteína determinado por análise de aminoácidos, indicando que 85% do extremo N está bloqueado por razão desconhecida. O primeiro aminoácido N-terminal de 15% da

enzima desbloqueada não pode ser determinado sem ambiguidade em ambas as experiências. Ala e Lis são os mais abundantes mas também são detectados Ser, Gli, Glu, Val e Leu todos em concentrações semelhantes.

O restante da sequência de aminoácidos N-terminais foi determinado como sendo:

Met Lis Ile Tir Arg Leu Ser Glu Leu Ser Fen ? Gln Val Glu Asn
Leu Lis Ala Arg ? ? Ile Asp

onde os pontos de interrogação indicam resíduos que não foram determinados a partir dos dados de sequenciação de aminoácidos.

160 μg de histidinol-desidrogenase foram secas e ressuspensas em 415 μl de 20 mM Tris-HCl, pH 8,0. Adicionou-se lisil endopeptidase [EC 3.4.21.50; Wako Chemicals, Osaka, Japan] para se conseguir uma concentração final de aproximadamente 33 $\mu\text{g/ml}$. Isto é equivalente a uma proporção de pesos de aproximadamente 1:500 de peptidase:proteína substrato. A digestão foi incubada à temperatura ambiente durante 24 horas e os peptídeos resultantes foram separados por HPLC de fase reversa numa coluna Aquapore RP-300 (C-8) (2,1 x 220 mm). A coluna foi eluída com um gradiente linear de 45 minutos de 0-70% acetonitrilo em 0,1% TFA a um fluxo de 220 $\mu\text{l/minuto}$. Os peptídeos que eluíram aos 17, 18, 32, 45 e 48 minutos foram colhidos e analisados por degradação automática de Edman comodescrito atrás. Obtiveram-se as seguintes sequências de aminoácidos:

Lis-C#17 Tre Glu Leu Ser Fen Ala Lis
 Lis-C#18 Tre Val Val Leu Ala Tre Pro Pro Tre Lis
 Lis-C#32 Glu Ala Fen Asp Val Ala Tir Asp Asn Ile Tir Ala
 Fen His Leu Ala Gln Lis
 Lis-C#45 Lis Fen Met Tre Val Gln Ser Leu Tre Glu Glu Gli
 Leu Arg Asn Leu Gli Pro Tir Val Ala Tre Met Ala
 Glu Ile Glu Gli Leu Asp Ala
 Lis-C#48 Ala Leu Ser His Ser Fen Tre Val Fen Ala Arg Asp
 Met Ile Glu Ala Ile Tre Fen Ser Asn Leu Tir Ala
 Pro Glu Lis

90 µg da proteína histidinol-desidrogenase foi seco e ressuspenso em 200 µl de 2% CnBr em ácido fórmico a 70%. A proteína foi digerida à temperatura ambiente durante 24 horas. Os peptídeos resultantes foram purificados exactamente como descrito atrás, excepto ter-se usado um gradiente de 0-100% de acetonitrilo. Os peptídeos que eluíram aos 6 e 18 minutos foram colhidos e sujeitos a degradação automática de Edman como descrito atrás. Obtiveram-se as seguintes sequências:

CNBr#6 Met Ala Glu Ile Glu Gli Leu Asp Ala His Lis Arg
 Ala Val Tre Leu Arg ? Lis Asp Ile Glu
 CNBr#18 Leu Ala Ile Pro Ala Gln Ile Ala Gli Arg Lis Tre
 Val Val Leu Ala Tre Pro

EXEMPLO 12: Obtenção da Sequência de cDNA da Histidinol-Desidrogenase

Três oligonucleótidos que correspondem a fracções das sequências de aminoácidos foram sintetizados pela síntese de fosforamidetos automática num sintetizador de DNA Applied Biosystems (Foster City, California) Modelo 380B.

As suas sequências e os resíduos de aminoácidos a que correspondem estão indicados abaixo:

EW25 5' TTAAGAATTCTAYGAYAAYATHHTAYGC 3'

JR03 5' CCYTCDATYTCDATCATRTC 3'

JR02 5' ATNGCYTCDATCATRTC 3'

onde D indica qualquer uma das bases A, T ou G; H indica as bases A, T ou C; R indica as purinas A ou G; Y indica as pirimidinas T ou C. EW25 é uma mistura de 48 oligonucleótidos compreendendo todas as possíveis sequências de DNA codificadoras da sequência de aminoácidos Tir Asp Asn Ile Tir Ala, encontrados dentro do peptídeo Lis-C#32. JR03 é uma mistura de 48 oligonucleótidos compreendendo os complementos de todas as sequências de DNA possíveis codificadoras da sequência Met Ala Ile Glu Gli, encontrada em ambos os peptídeos Lis-C#45 e CNBr#6. JR02 é uma mistura de 48 oligonucleótidos compreendendo as cadeias complementares de todas as sequências de DNA possíveis codificadoras da sequência de aminoácidos Asp Met Ile Glu Ala Ile encontradas dentro do peptídeo Lis-C#48.

As sequências dos peptídeos da couve estão alinhadas com a sequência traduzida do gene HIS4C de levedura [Donahue et al. (1982)], o qual codifica histidinol-desidrogenase. Encontrou-se que os peptídeos da couve têm cerca de 45% de identidade com a sequência de levedura nas suas regiões partilhadas. Usando tal alinhamento e assumindo que a sequência da couve é aproximadamente colinear com a sequência de levedura, Lis-C #32 fica a montante (i.e. na direcção do extremo N da proteína) relativamente a Lis-C #45 e CNBr #6, os quais ficam perto do extremo C da proteína aproximadamente 320 aminoácidos a jusante. Lis-C #48 fica entre estes peptídeos. Assim, EW25 deverá ficar relativamente perto do

extremo 5' do cDNA, JR03 deverá ficar perto do extremo 3' do cDNA e JR02 deverá ficar entre estes oligonucleótidos.

O RNA total foi preparado a partir de tecido de folhas de couve congeladas por extração com fenol seguido de precipitação com cloreto de lítio como descrito por Lagrimini et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7542-7546 (1987)]. Isolou-se mRNA Poli(A)⁺ a partir de RNA total usando um kit de isolamento rápido de mRNA poli(A) (Stratagene, La Jolla, California) exactamente como descrito nas instruções do fabricante. O mRNA foi enzimaticamente convertido em cDNA e clonado no vector lambda ZAP II usando um kit de síntese de ZAP-cDNA gigapack II (Stratagene, La Jolla, California) usando as instruções fornecidas juntamente com o kit pelo fabricante. A biblioteca de cDNA foi propagada e amplificada como descrito pelo fabricante do kit.

Preparou-se DNA total a partir de biblioteca usando reagente Lambdасorb (Promega Biotech, Madison, Wisconsin) pelo método descrito pelo fabricante. Realizou-se uma reacção em cadeia com polimerase [PCR; Saiki et al. (1988)] usando a biblioteca de DNA como molde e EW25 e JR03 como iniciadores. A reacção foi realizada num volume total de 50 µl, com 10 µg de DNA molde, 200 pmoles de cada uma das misturas de iniciadores, dATP, dCTP, dGTP e dTTP 100 µM cada, tampão de PCR 1X fornecido pelo fabricante (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, Connecticut) e 2,5 U de DNA-polimerase AmpliTaq (Perkin Elmer Cetus). A reacção teve 40 ciclos com o perfil de temperatura que se segue num DNA Thermocycler (Perkin Elmer Cetus): 94°C durante 45 segundos, 42°C durante 45 segundos e 72°C durante 45 segundos. Em cada um dos ciclos o passo de 72°C foi aumentado em 2 segundos.

Os produtos de PCR foram separados num gel de 2% de agarose de baixa temperatura de gelificação (Nu-Sieve, FMC

BioProducts, Rockland, Maine). Foram detectados vários fragmentos por coloração com brometo de etídio, um dos quais tem aproximadamente 975 pb de comprimento, o tamanho aproximado esperado. O gel foi transferido para membrana de nylon (GeneScreen Plus, NEN Research Products, Boston, MA) em 0,4 M NaOH como descrito por Reed e Mann (1985). O gel transferido foi hibridado com a mistura de oligonucleótidos JR02 que foi marcada com ^{32}P usando polinucleótido-cinase de T4 (New England Biolabs, Beverly, MA) e gama- ^{32}P ATP (New England Nuclear, Boston, MA). O fragmento com aproximadamente 975 pb foi especificamente detectado pela sonda JR02, indicando fortemente que ele compreende uma fração do cDNA da histidinol-desidrogenase.

O fragmento de PCR foi removido de um gel de agarose de baixa temperatura de gelificação, digerido com EcoRI e subclonado no plasmídeo pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA). A inserção de PCR subclonada foi marcada com ^{32}P por iniciação ao acaso usando o kit Prime Time (International Biotechnologies, New Haven, CT) e usado no despiste de levantamentos ("lifts") de placa da biblioteca de cDNA de couve em lambda ZAPII como descrito atrás. As placas que deram hibridação positiva foram purificadas e as suas inserções retiradas para o plasmídeo pBluescript in vivo usando o método descrito pelo fabricante do vector de clonagem lambda ZAP II (Stratagene, La Jolla, CA).

As sequências de DNA das inserções de cDNA de plasmídeo foram determinadas pelo método dideoxi usando um kit da Sequenase (United States Biochemical, Cleveland, OH). Um subclone do plasmídeo, designado pBSACabHdH7, contém uma inserção de 1613 pb que codifica uma proteína prevista que encaixa nas sequências dos peptídeos derivados da histidinol-desidrogenase, incluindo o peptídeo N.terminal, indicando um cDNA de tamanho completo ou quase completo (ver, SEQ ID NO: 1 para a sequência de DNA).

EXEMPLO 13: Preparação de HDH Recombinante Usando um Sistema de Expressão de Baculovírus

13.1 Cultura de células de insecto

Células Sf9 foram mantidas como uma cultura em monocamada em meio de Grace suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 0,33% (p/v) Yeastolate, 0,33% (p/v) de hidrolisato de lactalbumina e 50 µg/ml de sulfato de gentamicina a 27°C.

13.2 Construção e isolamento de vírus recombinantes

O clone de cDNA de histidinol-desidrogenase da couve (pBSACabDdH7) foi digerido com as endonucleases KpnI e BamHI. O fragmento KpnI-BamHI (1,6 Kb) de HDH, incluindo a região codificadora da sequência de trânsito para o cloroplasto putativa de 93 pb, foi isolado e ligado a pVL1393 duplamente digerido com KpnI-BamHI. O plasmídeo de transferência recombinante (pVL1393-/HDH) contendo o cDNA de HDH foi então integrado no genoma de AcnNPV por recombinação homóloga mediada por células. Um µg de DNA viral foi misturado com 80 µg do plasmídeo pVL1393/HDH em 950 µl de tampão HEPES 20 mM, 1 mM Na₂HPO₄, 5 mM KCl, 140 mM NaCl e 10 mM glucose (pH 7,0). Após precipitação com 50 µl de 2,5 M CaCl₂, o segmento de DNA foi colocado numa cultura em monocamada de células Sf9 e a cultura foi incubada à temperatura ambiente. Após 1 h, o sobrenadante da cultura foi substituído por 2 ml de meio de cultura. Após incubação a 27°C durante 4 dias, o sobrenadante foi diluído 10-1000 vezes e sujeito a purificação em placas. Os clones de baculovírus recombinantes AcNPV-HDH foram inicialmente identificados por análise de hibridação de DNA e posteriormente purificados por observação num microscópio de dissecação.

13.3 Ensaio enzimático

A actividade enzimática foi medida espectrofotometricamente determinando a absorvância do NADH formado a 340 nm como descrito anteriormente (Nagai & Scheidegger, 1991). A mistura de reacção enzimática continha tampão 100 mM Gli-NaOH (pH 9,2), 0,5 mM MnCl_2 , 1 mM NAD^+ , 2 mM histidinol e enzima. Uma unidade de actividade da enzima foi definida como a quantidade de enzima que cataliza a formação de $1\mu\text{M}$ NADH por minuto nas condições do ensaio.

13.4 Expressão e purificação de HDH recombinante

A solução viral recombinante purificada foi amplificada para um título de $1-2 \times 10^8$ PFU/ml. As células foram infectadas com o vírus a uma MOI de 5-10 e incubadas a 27°C. 5 dias após a infecção as células infectadas (1×10^8 células, cultura em monocamada de $5 \times 150 \text{ cm}^2$) as células foram homogenizadas em 10 ml de tampão Tris-HCl 10 mM (pH 7,4) (tampão A) usando um sonificador Branson (SONIFIER 450). O homogenato de células foi centrifugado a 10000 g durante 20 minutos e o sobrenadante foi diluído com tampão A para uma concentração adequada. Retirou-se o sal da amostra em Sephadex G-25. Após incubação a 30°C durante 2 horas o extracto de células bruto foi aplicado numa coluna de permuta aniónica Mono-Q HR 16/10 equilibrada com tampão A. Após lavagem intensa da coluna com tampão A, a proteína ligada foi eluída por um gradiente linear de NaCl (0-300 mM) em tampão A. As fracções activas foram reunidas e usadas para estudos posteriores.

Como resultado da purificação de enzimas atrás descrita obtiveram-se duas proteínas diferindo no seu peso molecular. A forma maior, contendo ainda 10 aminoácidos da sequência sinal putativa, pode ser totalmente convertida na forma mais pequena

por incubação do lisado celular durante 2 horas a 45°C. Esta conversão proteolítica é completamente inibida na presença do inibidor de H-proteases leupeptina mas não na presença de PMSF [fluoreto de fenilmetanossulfonilo]. O extremo N da maior parte [80% do total] da forma mais pequena começou na posição -1, a parte mais pequena em +1 relativamente ao extremo N da enzima madura isolada a partir de couve. Todas as três formas de histidinol-desidrogenase recombinante apresentaram propriedades cinéticas idênticas à enzima da couve tipo selvagem.

EXEMPLO 14: Preparação de clones de cDNA codificadores da histidinol-desidrogenase de trigo

Dois clones de cDNA de histidinol-desidrogenase do trigo [designados SA4 e SA5] foram obtidos de forma análoga ao processo descrito no EXEMPLO 12 usando o clone da couve como uma sonda de hibridação em condições de baixa restringência.

Num primeiro passo preparou-se RNA total a partir de germén de trigo [Sigma Chemical Co., St. Louis, MO] como descrito no EXEMPLO 12. RNA poli(A)+ foi isolado e construída uma biblioteca de cDNA como descrito no EXEMPLO 12. Uma fracção da biblioteca foi cultivada em placas do fago lambda e prepararam-se réplicas em filtros seguindo métodos convencionais como descrito em Maniatis et al. (1982).

O cDNA clonado da histidinol-desidrogenase isolada de acordo com o EXEMPLO 12 e apresentado em SEQ ID NO: 1 foi marcado radioactivamente no EXEMPLO 12 e hibridado com os filtros numa solução consistindo em 7% de dodecil-sulfato de sódio, 0,5% de fosfato de sódio 0,5M pH 7, 1% de albumina sérica bovina, 1 mM EDTA [Church e Gilbert (1984)] a 50°C. Os filtros foram lavados numa solução consistindo em 1% de dodecilsulfato de sódio, 40 mM fosfato de sódio pH 7, 125 mM cloreto de sódio, 1 mM EDTA a 50°C. Estas condições de hibridação e restringência de lavagem reduzidas permitem a detecção de cDNAs de trigo tendo homologia substancial de sequências com a sequência da couve.

As colónias que deram hibridação positiva foram purificadas por ciclos sequenciados de diluição, sementeira e despiste. Os plasmídeos contendo inserções de cDNA do fago que deu hibridação positiva foram retiradas in vivo e as suas sequências de DNA determinadas como descrito no EXEMPLO 12. As sequências de

dois cDNAs de trigo estreitamente relacionados mas distintos, designados SA4 e SA5, estão apresentadas em SEQ ID NO:2 e 3. Ambas as sequências são 72% idênticas à sequência do clone da couve apresentada em SEQ ID NO:1 e são 96% idênticas uma à outra.

EXEMPLO 15: Construção de pCGN1761 (uma cassette dupla de promotor/terminador contendo resistência à ampicilina).

pCGN1761 contém um duplo promotor 35S de CaMV e a região 3' tml com um sítio EcoRI entre eles contido num esqueleto de plasmídeo derivado do pUC. A cassette promotor-EcoRI-sítio de processamento 3' é delimitada por múltiplos sítios de restrição para uma remoção fácil. O plasmídeo seriva através de uma série de passos (ver abaixo) de um plasmídeo inicial de duplo 35S, pCGN2113, o qual por sua vez deriva de pCGN164 e de pCGN638. O plasmídeo pCGN2113 foi depositado na ATCC em 22 de Março de 1989, com o número de acesso 40587 para fins de processos de patente de acordo com os regulamentos do Tratado de Budapeste.

15.1 Construção ds pCGN164

O fragmento AluI de CaMV (pb 7144-7735) [Gardner et al., (1981)] foi obtido por digestão com AluI e clonado no sítio HincII de M13mp7 [Vieira e Messing (1982)] para criar C614. Uma digestão com EcoRI de C614 produz o fragmento EcoRI de C614 contendo o promotor 35S que foi clonado no sítio EcoRI de pUC8 [Vieira e Messing (1982)] para produzir pCGN146. Para preparar a região do promotor, o sítio BglII (pb 7670) foi tratado com BglII e Bal31 e subsequentemente um adaptador BglII foi ligado ao DNA tratado com Bal31 para produzir pCGN147. pCGN147 foi digerido com EcoRI HphI e o fragmento resultante EcoRI-HphI contendo o

promotor 35S foi ligado a M13mp8 digerido com EcoRI-SmaII [Vieira e Messing, Gene 19:259-268 (1982)] para criar pCGN164.

15.2 Construção de pCGN638

A digestão de CaMV10 [Gardner et al. (1981)] com BglII produz um fragmento BglII contendo uma região do promotor 35S (pb 6493-7670) o qual foi ligado ao sítio BamHI do pUC19 [Norrander et al. (1983)] para criar pCGN638.

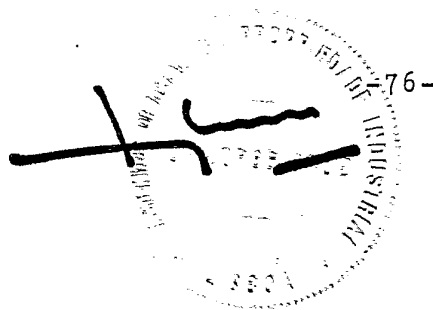
15.3 Construção de pCGN2113

pCGN164 foi digerido com EcoRV e BamHI para libertar um fragmento EcoRV-BamHI que continha uma fracção do promotor 35S (pb 7340-7433); pCGN638 foi digerido com HindIII e EcoRV para libertar o fragmento HindIII-EcoRV contendo uma fracção diferente do promotor 35S (pb 6493-7340). Estes dois fragmentos foram ligados a pCGN986 o qual foi então digerido com HindIII e BamHI para remover o fragmento HindIII-BamHI contendo o promotor 35S; esta ligação produz pCGN639, a qual contem o esqueleto da região 3' tml do pCGN986 e os dois fragmentos do promotor 35S do pCGN164 e pCGN638. pCGN638 foi digerido com EcoRV e DdeI para libertar um fragmento do promotor 35S (pb 7070-7340); o fragmento foi tratado com o fragmento Klenow da DNA-polimerase I para criar extremos cerses e foi ligado ao sítio EcoRV do pCGN639 para produzir pCGN2113 tendo o fragmento na orientação correcta.



15.4 Construção de pCGN1761

pCGN2113 foi digerido com EcoRI e o plasmídeo foi ligado na presença de um adaptador de DNA sintético contendo um sítio XbaI e um sítio BamHI (o adaptador contem extremos coesivos EcoRI em ambos os extremos, mas as bases adjacentes são tais que o sítio EcoRI não é reconstruído neste local) para produzir pCGN2113M. pCGN2113M foi digerido totalmente com SacI e depois sujeito a digestão parcial com BamHI. Este DNA foi então tratado com DNA-polimerase de T4 para criar extremos cerses e um adaptador EcoRI foi ligado ao plasmídeo de extremos cerses. Após trnasformação um clone do plasmídeo que contem um sítio único EcoRI entre o promotor e a região 3' tml foi seleccionado e designado pCGN1761.



- Adams, J. Biol. Chem. 217:325-344 (1955)
- Allen G, "Sequencing of proteins and peptides", in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol 8, Eds. TS Work and RH Bordon, Elsevier, North-Holland, Biomedical Press, Amsterdam (1981)
- Bevan *et al*, Nature 304: 184-187 (1983).
- Binding, "Regeneration of Plants," in Plant Protoplasts, pp. 21-37 (CRC Press, Boca Raton, 1985)
- Bitar *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 493:429-440 (1977)
- Bradford, Anal.Biochem. 72:248-254 (1976)
- Burger *et al.*, Biochem. J. 181:771-774 (1979)
- Burger *et al.*, Eur. J. Biochem. 116:137-142 (1981)
- Christou *et al*, Plant Physiol. 87:671-674 (1988)
- Chu *et al.*, Scientia Sinica, Vol. XVIII(No. 5):659-668 (1975)
- Crossway *et al*, BioTechniques 4:320-334 (1986)
- Dale, "Protoplast Culture and Plant Regeneration of Cereals and Other Recalcitrant Crops," in Protoplasts 1983 - Lecture Proceedings, pp. 31-41 (Birkhauser, Basel, 1983)
- Datta *et al*, Bio/Technology 8:736-740 (1990)
- Davey, "Recent Developments in the Culture and Regeneration of Plant Protoplasts," Protoplasts 1983)
- Davis *et al*, Advanced Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1980)
- Donahue *et al.*, Gene 18:47-59 (1982)
- Dougall and Fulton, Plant Physiol. 42:941-945 (1967)
- Eccleston *et al.*, J. Biol. Chem. 254:11399-11404 (1979)
- Elzen *et al.*, Plant Molecular Biology 5: 299-392 (1985)
- Erlich, (ed.), PCR Technology, Stockton Press, New York (1989)
- Evans *et al*, "Protoplast Isolation and Culture," in Handbook of Plant Cell Culture 1:124-176 (MacMillan Publishing Co., New York 1983)
- Fromm *et al*, Bio/Technology 8:833-839 (1990)
- Gardner *et al*, Nucl. Acids Res. 9: 2871-2888 (1981)
- Gordon-Kamm *et al*, Plant Cell 2:603-618 (1990)
- Grimsley *et al*, EP-A 0 267 159

- Gorisch and Holke, Eur. J. Biochem. 150:305-308 (1985)
 Grubmeyer *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 272:311-317 (1989)
 Grubmeyer *et al.*, Biochem. 28:8174-8180 (1989)
 Hake and Freeling, Nature 320, 621-623 (1986)
 Heim *et al.*, Plant Physiol. 91:1226-1231 (1989)
 Hinchee *et al* Biotechnology 6: 915-921 (1988)
 Hohn *et al*, Current Topics in Microbiology and Immunology 96:194-220 (1982)
 Hooykas-Van Slogteren *et al.*, Nature 311:763-764 (1984)
 Horsch *et al*, Science 227: 1229 (1985)
 Jefferson, Plant Molecular Biology Reporter 5: 387-405 (1987)
 Kanamori *et al.*, J. Chromatog. 363:231-242 (1986)
 Keesey *et al.*, J. Biol. Chem. 254:7427-7433 (1979)
 Klein *et al*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85:4305-4309 (1988)
 Klein *et al* Bio/Technology 6:559-563 (1988)
 Klein *et al*, Plant Physiol. 91:440-444 (1989)
 Kumpaisal *et al*, Plant Physiol. 85:145-151 (1987)
 Laemmli, Nature 227:680-685 (1970)
 Lagrimini *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7542-7546 (1987)
 Leung *et al*, Technique 1:11-15 (1989)
 McBride *et al*, Plant Molecular Biology 14: 266-276 (1990)
 Maniatis *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1982)
 Matsumoto *et al.*, J. Biochem. 85:1091-1098 (1979)
 Maxam and Gilbert, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74:560-564 (1977)
 McCabe *et al*, Bio/Technology 6:923-926 (1988)
 McCutcheon's Detergents and Emulsifiers Annual," MC Publishing Corp. Ringwood, New Jersey, 1979
 Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1972)
 Morelli *et al*, Nature 315: 200-204 (1985)
 Mullis *et al*, Meth. Enzymol., 155: 335-350 (1987)
 Negrutiu *et al.*, Mol. Gen. Genet. 199:330-337 (1985)
 Neuhaus *et al*, Theor Appl Genet 75, 30-36 (1987)
 Norrander *et al.*, Gene 26: 101-106 (1983)
 Paszkowski *et al*, EMBO J. 3:2717-2722 (1984)
 Petit *et al*, Mol. Gen. Genet. 202: 388 (1986)

- Pierce *et al*, Plant Gene Systems and their Biology, (Alan R. Liss, Inc.) pp. 301-310
- Poethig, Nature 336, 82-83 (1988)
- Reed and Mann, Nucleic Acids Res. 13:7207-7221 (1985)
- Riggs *et al*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83:5602-5606 (1986)
- Saiki *et al.*, Science 239:487-491 (1988)
- Sanford *et al*, U.S. Patent 4,945,050
- Sanford *et al*, Particulate Science and Technology 5:27-37 (1987)
- Sanger, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74:5463-5467 (1977)]
- Schenk and Hildebrandt, Can J Botany 50: 199-204 (1972)
- Schocher RJ *et al*, Bio/Technology, 4: 1093-1096 (1986)
- Segel, Biochemical Calculations, 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York (1976);
- Suelter, A Practical Guide to Enzymology, John Wiley and Sons, New York (1985).
- Shaffer *et al.*, Brookhaven Symp. Biol. 23:250-270 (1972)
- Sherman *et al*, Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1983)
- Shillito *et al*, Bio Technology, 3: 1099-1103 (1985)
- Shoutte and Bolstein, Method. Enzymol. 100:457-468 (1983)
- Simpson and Nice, Biochem Intl, 8: 787 (1984)
- Sisely and Wood, "Encyclopedia of Surface Active Agents," Chemical Publishing Co., Inc. New York, 1980.
- Skyring *et al.*, Anal. Biochem., 36:511-520 (1970)
- Somerville and Ogren, In Edelman *et al* (eds) Methods in Chloroplast Molecular Biology, Elsevier Biomedical Press, pp. 129-138 (1982)
- Southern, J. Mol. Biol. 98 :503 (1975)
- Strauss *et al*, Planta 163:554-562 (1985)
- Strickler *et al.*, Anal. Biochem. 140:553-566 (1984)
- Thompson *et al*, EMBO J 6: 2519-2523 (1987)
- Tomes *et al*, in Cereal Tissue and Cell Culture, pp. 175-203 (Bright, ed.) (1985)("Tomes 2")
- Velten *et al.*, EMBO J. 3: 2723-2730 (1984)
- Vieira and Messing, Gene 19: 259-268 (1982)
- Wang Y-C *et al*, Plant Mol. Biol. 11: 433-439 (1988)
- Weissing *et al*, Annual Rev. Genet. 22:421-477 (1988)
- Wiater *et al.*, Acta Biochim. Polonica 18:299-307 (1971)
- Wong *et al.*, Phytochem. 20:1831-1834 (1981)
- Wong and Mazelis, Phytochem. 20:1831-1834 (1981)

Yamada and Sato, Plant & Cell Physiol. 19:691-699 (1978)

Yavada, Mol. Gen. Genet. 170:109-111 (1979)

Yourno and Ino, J. Biol. Chem. 243:3273-3276 (1968)

Zoller and Smith, Meth. Enzymol. 100, 468-500 (1983)

Patentliteratur:

EP-A 0 189 707

EP-A 0 267 159

EP-A 0 306 139

EP-A 0 434 616

WO 89/07647

US-P 4,761.373

SEQ ID NO: 1

TIPO DE SEQUÊNCIA: Nucleótidos com correspondente proteína

COMPRIMENTO DA SEQUÊNCIA: 1613 pares de bases

TIPO DE CADEIA: cadeia mais (codificadora)

TOPOLOGIA: linear

TIPO DE MOLÉCULA: cDNA cópia de mRNA

ORGANISMO FONTE ORIGINAL: tecido da folha de couve

FONTE EXPERIMENTAL IMEDIATA

NOME DO CLONE CELULAR: plasmídeo pBSACabHdH7

PROPRIEDADES: actividade de histidinol-desidrogenase

AATTCGGCAC	GAGCCTATTC	GCCGGCGAAC	ACACTCCTAT	TTGAGCAAAC	50
CCGGTGAGG	ATG TCA TTC GAT CTA TCT CGT CTC TCC CTC ACT TCC	95			
	Met Ser Phe Asp Leu Ser Arg Leu Ser Leu Thr Ser				
TCG CCT CGT CTC TCG TTT CTC ACT CGC ACT GCT ACT AAG AAA GGA	140				
Ser Pro Arg Leu Ser Phe Leu Thr Arg Thr Ala Thr Lys Lys Gly					
TTC GTT AGG TGT TCG ATG AAG TCG TAC AGA TTA TCT GAA CTT AGT	185				
Phe Val Arg Cys Ser Met Lys Ser Tyr Arg Leu Ser Glu Leu Ser					
TTC TCT CAA GTT GAG AAC TTG AAG GCA CGC CCT CGC ATT GAC TTC	230				
Phe Ser Gln Val Glu Asn Leu Lys Ala Arg Pro Arg Ile Asp Phe					
TCT TCC ATT TTC ACC ACT GTT AAC CCA ATC ATC GAC GCT GTT CGT	275				
Ser Ser Ile Phe Thr Thr Val Asn Pro Ile Ile Asp Ala Val Arg					
AGC AAA GGA GAT ACT GCT GTC AAA GAG TAT ACA GAG AGA TTT GAC	320				
Ser Lys Gly Asp Thr Ala Val Lys Glu Tyr Thr Glu Arg Phe Asp					
AAA GTC CAG CTC AAT AAA GTG GTG GAG GAT GTG TCC GAA CTT GAT	365				
Lys Val Gln Leu Asn Lys Val Val Glu Asp Val Ser Glu Leu Asp					
ATC CCT GAG CTC GAC TCC GCA GTT AAA GAA GCG TTT GAT GTT GCG	410				
Ile Pro Glu Leu Asp Ser Ala Val Lys Glu Ala Phe Asp Val Ala					

TAT GAC AAC ATT TAT GCA TTT CAC TTT GCC CAA ATG TCA ACT GAG 455
 Tyr Asp Asn Ile Tyr Ala Phe His Phe Ala Gln Met Ser Thr Glu
 AAA AGC GTT GAG AAT ATG AAA GGT GTA AGA TGT AAA AGG GTG TCG 500
 Lys Ser Val Glu Asn Met Lys Gly Val Arg Cys Lys Arg Val Ser
 AGA TCT ATT GGT TCT GTT GGT CTT TAT GTG CCT GGT GGA ACT GCT 545
 Arg Ser Ile Gly Ser Val Gly Leu Tyr Val Pro Gly Gly Thr Ala
 GTT TTG CCA TCT ACT GCT TTG ATG CTT GCT ATT CCT GCT CAG ATT 590
 Val Leu Pro Ser Thr Ala Leu Met Leu Ala Ile Pro Ala Gln Ile
 GCT GGA TGT AAA ACA GTT GTC CTC GCA ACT CCA CCA ACT AAG GAA 635
 Ala Gly Cys Lys Thr Val Val Leu Ala Thr Pro Pro Thr Lys Glu
 GGA AGC ATA TGT AAG GAG GTG CTG TAT TGT GCC AAG AGG GCT GGT 680
 Gly Ser Ile Cys Lys Glu Val Leu Tyr Cys Ala Lys Arg Ala Gly
 GTA ACT CAC ATT CTT AAA GCT GGT GGA GCA CAG GCT ATA GCT GCC 725
 Val Thr His Ile Leu Lys Ala Gly Gly Ala Gln Ala Ile Ala Ala
 ATG GCC TGG GGG ACA GAT TCT TGT CCT AAG GTT GAG AAG ATT TTT 770
 Met Ala Trp Gly Thr Asp Ser Cys Pro Lys Val Glu Lys Ile Phe
 GGT CCT GGG AAT CAG TAT GTT ACA GCT GCT AAG ATG ATT CTG CAA 815
 Gly Pro Gly Asn Gln Tyr Val Thr Ala Ala Lys Met Ile Leu Gln
 AAC AGC GAG GCA ATG GTT TCG ATT GAT ATG CCT GCT GGC CCT TCA 860
 Asn Ser Glu Ala Met Val Ser Ile Asp Met Pro Ala Gly Pro Ser
 GAA GTT CTT GTT ATC GCT GAT GAA CAT GCT AGT CCA GTT TAC ATT 905
 Glu Val Leu Val Ile Ala Asp Glu His Ala Ser Pro Val Tyr Ile
 GCA GCC GAC TTA CTT TCT CAG GCT GAG CAT GGT CCA GAT AGT CAG 950
 Ala Ala Asp Leu Leu Ser Gln Ala Glu His Gly Pro Asp Ser Gln
 GTT GTT CTT GTT GTT GTA GGC GAT GGT GTA AAT CTC AAA GCC ATC 995
 Val Val Leu Val Val Val Gly Asp Gly Val Asn Leu Lys Ala Ile
 GAA GAA GAA ATT GCT AAA CAA TGC AAA AGC CTT CCT AGA GGC GAG 1040
 Glu Glu Glu Ile Ala Lys Gln Cys Lys Ser Leu Pro Arg Gly Glu
 TTT GCT TCA AAA GCT CTA AGT CAC AGC TTC ACA GTA TTT GCT CGA 1085
 Phe Ala Ser Lys Ala Leu Ser His Ser Phe Thr Val Phe Ala Arg
 GAT ATG ATT GAG GCA ATA ACT TTC TCA AAC CTG TAT GCA CCT GAA 1130
 Asp Met Ile Glu Ala Ile Thr Phe Ser Asn Leu Tyr Ala Pro Glu
 CAC TTG ATC ATC AAT GTC AAA GAC GCT GAG AAA TGG GAG GGA CTG 1175
 His Leu Ile Ile Asn Val Lys Asp Ala Glu Lys Trp Glu Gly Leu
 ATA GAG AAC GCA GGT TCG GTT TTC ATA GGG CCG TGG ACT CCT GAG 1220
 Ile Glu Asn Ala Gly Ser Val Phe Ile Gly Pro Trp Thr Pro Glu

AGT GTT GGT GAT TAC GCG AGC GGG ACA AAC CAC GTT CTT CCA ACG 1265
 Ser Val Gly Asp Tyr Ala Ser Gly Thr Asn His Val Leu Pro Thr

TAC GGG TAT GCG AGA ATG TAC AGT GGC GTC TCT CTC GAC TCT TTC 1310
 Tyr Gly Tyr Ala Arg Met Tyr Ser Gly Val Ser Leu Asp Ser Phe

CTG AAG TTC ATG ACT GTA CAG TCC TTG ACA GAG GAA GGT CTG CGA 1355
 Leu Lys Phe Met Thr Val Gln Ser Leu Thr Glu Glu Gly Leu Arg

AAC CTT GGT CCG TAT GTT GCG ACT ATG GCT GAA ATT GAA GGT CTA 1400
 Asn Leu Gly Pro Tyr Val Ala Thr Met Ala Glu Ile Glu Gly Leu

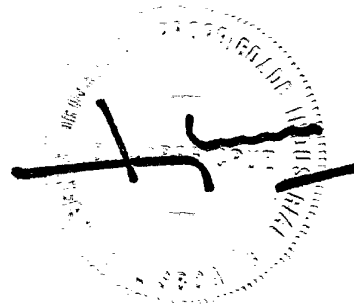
GAT GCA CAC AAG AGA GCC GTC ACT CTC AGA CTC AAG GAT ATC GAA 1445
 Asp Ala His Lys Arg Ala Val Thr Leu Arg Leu Lys Asp Ile Glu

GCC AAA CAG ACC CAA ACA AAG TGA AATGAATGGC TGTCTTCATA 1489
 Ala Lys Gln Thr Gln Thr Lys *

TTCAAATGAG GTGACATTGG TTTAAAGAGA TAATAATAAT AAGAATAATA 1539

TAAGAGATGT TGTAACACTC TCTGTCATAA TCTGGATTTT CTTTCATTAT 1589

TGAAATTTGA ATCCTTTCAC GCGT 1613



SEQ ID NO: 2

TIPO DE SEQUÊNCIA: Nucleótidos

COMPRIMENTO DA SEQUÊNCIA: 1137 pares de bases

TIPO DE CADEIA: cadeia mais (codificadora)

TOPOLOGIA: linear

TIPO DE MOLÉCULA: cDNA cópia de mRNA

ORGANISMO FONTE ORIGINAL: trigo

FONTE EXPERIMENTAL IMEDIATA

NOME DO CLONE CELULAR: plasmídeo

PROPRIEDADES: fração do mRNA histidinol-desidrogenase

CARACTERÍSTICAS: codão de paragem em 951

GGCACGAGGC TGTATGTTCC AGGGGGCACT GCAGTCTTGC CTTCAACTGC	50
ATTGATGCTT GCTGTGCCTG CACAGATTGC TGGATGCAAA ACTGTAGTTC	100
TTGCCACACC CCCTAGTCGT GATGGTAGCA TATGTAAGGA GGTTCCTTAC	150
TGTGCTAAAA AAGCTGGTGT TACACACATA CTAAAAGCTG GGGGAGCTCA	200
GGCAATCTCC GCTATGGCAT GGGGAACTGC ATCATGCCCA AAGGTTGAGA	250
AAATATTTGG TCCCGGCAAC CAGTATGTCA CAGCTGCTAA AATGATTCTT	300
CAGAACAGCG AAGCTATGGT CTCTATAGAC ATGCCTGCTG GCCCTTCAGA	350
AGTTCTGGTA ATCGCTGACA AATATGCCAA CCCAGTTCAT GTTGCCGCTG	400
ATCTGCTATC TCAGGCAGAA CATGGCCCAG ATAGTCAGGT TGTTCAGTT	450
ATTGCGGGAG ATGGTGTTGA TTTAGCTGCC ACTGAAGCAG AAGTTAGCAA	500
GCAGTGTGAT GCTCTTCCTA GAGGCGACTT TGCTTCCAAA GCACTTGGCC	550



ACAGTTTCAC	TGTGTTTGCC	AGAGATATGG	CTGAGGCATT	ATCGTTCTCA	600
AATATGTATG	CTCCTGAGCA	TTTGATCATC	AATGTAAAGG	ATGCTGAGCA	650
ATGGGAGGAG	CTCATCGAGA	ATGCAGGGTC	AGTTTTCTTG	GGACAATGGA	700
CCCCCGAGAG	CGTCGGTGAC	TACGCTAGTG	GGACGAACCA	CGTCCTCCCA	750
ACCTACGGTT	ACGCGAGGAT	GTACAGCGGT	GTGTCGCTGA	ATTCTTTCCT	800
CAAGTACATC	ACTGTTCAAT	CCCTGACTGA	AGNAGGGCTG	AGAAGGCTGG	850
GTCCCTACGT	CGCAAAGATG	GCAGAAGTCG	AAGGCCTAGA	AGCGCACAAG	900
CGAGCTGTTA	CCCTCAGACT	GCAAGAGATC	GAAGCCACTG	TAAGTGTTTA	950
AACTGTTAAC	ATGGTCTGTT	GTGCCAGTCT	ATTTGATGCT	TGGGAAGTGA	1000
TATTTTTCTT	AATTCTTATC	GGATGGGACT	TGCCAGAGTT	TAAGGTGAAT	1050
ACGAAGCTGT	TTCATGGAAT	AATGCTACTT	ATGTCGATCC	GTAAATGAA	1100
TAAACTTGTG	AGTACAGTCT	CTAAAAAAAA	AAAAAAA		1137

SEQ ID NO: 3

TIPO DE SEQUÊNCIA: Nucleótidos

COMPRIMENTO DA SEQUÊNCIA: 995 pares de bases

TIPO DE CADEIA: cadeia mais (codificadora)

TOPOLOGIA: linear

TIPO DE MOLÉCULA: cDNA cópia de mRNA

ORGANISMO FONTE ORIGINAL: trigo

FONTE EXPERIMENTAL IMEDIATA

NOME DO CLONE CELULAR: plasmídeo

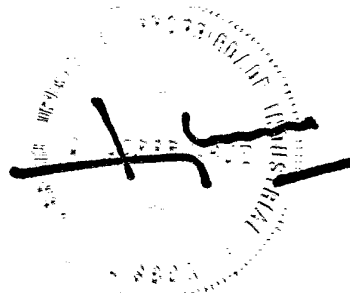
PROPRIEDADES: fracção do mRNA histidinol-desidrogenase

CARACTERÍSTICAS: codão de paragem em 828

GGCACGAGAT GTAAGGAGGT TCTTTACTGT GCCAAAAAAG CTGGTGTTAC	50
ACACATACTA AAAGCTGGGG GAGCTCAGGC AATCTCCGCT ATGGCATGGG	100
GAACCGCATC ATGCCCAAAG GTTGAGAAAA TATTTGGTCC TGGCAACCAG	150
TATGTCACAG CTGCTAAAAT GATTCTTCAG AACAGCGAAG CTATGGTCTC	200
TATAGACATG CCTGCTGGCC CTTCAGAAGT TCTGGTAATT GCTGACAAAT	250
ATGCCAACCC AGTTCATGTT GCCGCTGATC TGCTATCTCA GGCAGAACAT	300
GGCCCAGATA GTCAGGTTGT TCTAGTTATT GCTGGAGATG GTGTTGATTT	350
AGGTGCCATT GAAGCAGAAG TTAGCAAGCA GTGCGATGCT CTTCTAGAG	400
GCGACTTTGC TTCAAAGCA CTTGGCCACA GTTTCCTGT GTTTGNCAAG	450
GATATGGTTG AGGNATTATC GTTCTCAAAT ATGTATGCTC CTGAGCATTT	500
GATCATCAAC GTAAAGGATG CTGAGCAATG GGAGGAGCTC ATCGAGAACG	550



CAGGGTCAGT TTTCTTGGGA CAATGGACCC CCGAGAGCGT GGGTGACTAT 600
GCCAGTGGGA CGAACCACGT CCTCCCAACC TACGGTTACG CGAGGATGTA 650
CAGCGGTGTG TCGCTGAACT CTTTCCTCAA GTACATCACT GTTCAATCCC 700
TGAAGAAGA AGGGCTGAGA AGGCTGGGCC CCTACGTCGC AAAGATGGCA 750
GAAGTCGAAG GGCTAGAAGC GCACAAGCGA GCTGTTACCC TCAGACTGCA 800
AGAGGTCGAA GCCACTGTAA CTGTGTAAAC TGTTAGCATG GTCTGTTGTG 850
CCAGTCTATT TGATGCTTGG GGACTGATAT TTTTCTTCAT TTTTATCGGA 900
TGGAACCTGC CAGAGTTTAA GGTGAAGAAT ACGAAGCTGT TTCATGGAAT 950
AATGCTACTT ATGTCGATCT GTTAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAA 995



REIVINDICAÇÕES

1ª. - Método para a produção de uma proteína histidinol-desidrogenase purificada a partir de plantas, caracterizado por compreender:

(a) a exposição de um extracto de proteína a uma coluna de cromatografia de permuta iônica para produzir um primeiro eluato na presença de um gradiente linear;

(b) a exposição do primeiro eluato a uma coluna de cromatografia de afinidade para produzir um segundo eluato na presença de um solvente de deslocamento adequado, em que a referida coluna de cromatografia compreende um ligando específico para a histidinol-desidrogenase;

(c) o armazenamento do segundo eluato.

2ª. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido ligando compreender histidinol e/ou histidinal.

3ª. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido solvente de deslocamento ser um contendo uma substância que é semelhante ao ligando usado na coluna de afinidade.

4ª. - Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o referido solvente de deslocamento ser imidazole.

5ª. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a referida coluna de cromatografia de permuta iônica compreender uma resina derivada com dietil-amino-etilo (DEAE).

6ª. - Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por a referida coluna de cromatografia de permuta iônica compreender uma celulose derivada com DEAE.

7ª. - Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por a referida coluna de cromatografia de permuta iônica compreender DEAE-Toyopearl.

8ª. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido gradiente linear compreender um tampão de equilíbrio e um gradiente salino adequado.

9ª. - Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por o referido gradiente salino compreender NaCl de 0 a pelo menos 500 mM.

10ª. - Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por o referido gradiente salino compreende NaCl de 0 a cerca de 500 mM.

11ª. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se obter uma proteína vegetal essencialmente pura apresentando actividade de histidinol-desidrogenase.

12ª. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se obter uma proteína essencialmente pura tendo uma sequência de aminoácidos idêntica ou substancialmente homóloga de uma sequência proteica de SEQ ID NO:1:

AATTCGGCAC GAGCCTATTC GCCGGCGAAC ACACTCCTAT TTGAGCAAAC 50

CCGGTGAGG ATG TCA TTC GAT CTA TCT CGT CTC TCC CTC ACT TCC 95
Met Ser Phe Asp Leu Ser Arg Leu Ser Leu Thr Ser

TCG CCT CGT CTC TCG TTT CTC ACT CGC ACT GCT ACT AAG AAA GGA 140
Ser Pro Arg Leu Ser Phe Leu Thr Arg Thr Ala Thr Lys Lys Gly

TTC GTT AGG TGT TCG ATG AAG TCG TAC AGA TTA TCT GAA CTT AGT 185
Phe Val Arg Cys Ser Met Lys Ser Tyr Arg Leu Ser Glu Leu Ser

TTC TCT CAA GTT GAG AAC TTG AAG GCA CGC CCT CGC ATT GAC TTC 230
Phe Ser Gln Val Glu Asn Leu Lys Ala Arg Pro Arg Ile Asp Phe

TCT TCC ATT TTC ACC ACT GTT AAC CCA ATC ATC GAC GCT GTT CGT 275
Ser Ser Ile Phe Thr Thr Val Asn Pro Ile Ile Asp Ala Val Arg

AGC AAA GGA GAT ACT GCT GTC AAA GAG TAT ACA GAG AGA TTT GAC 320
Ser Lys Gly Asp Thr Ala Val Lys Glu Tyr Thr Glu Arg Phe Asp

AAA GTC CAG CTC AAT AAA GTG GTG GAG GAT GTG TCC GAA CTT GAT 365
Lys Val Gln Leu Asn Lys Val Val Glu Asp Val Ser Glu Leu Asp

ATC CCT GAG CTC GAC TCC GCA GTT AAA GAA GCG TTT GAT GTT GCG 410
Ile Pro Glu Leu Asp Ser Ala Val Lys Glu Ala Phe Asp Val Ala

TAT GAC AAC ATT TAT GCA TTT CAC TTT GCC CAA ATG TCA ACT GAG 455
Tyr Asp Asn Ile Tyr Ala Phe His Phe Ala Gln Met Ser Thr Glu

AAA AGC GTT GAG AAT ATG AAA GGT GTA AGA TGT AAA AGG GTG TCG 500
Lys Ser Val Glu Asn Met Lys Gly Val Arg Cys Lys Arg Val Ser

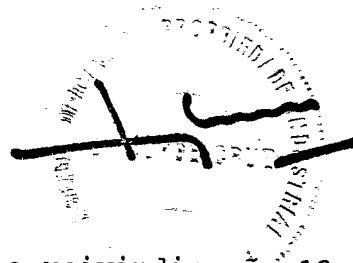
AGA TCT ATT GGT TCT GTT GGT CTT TAT GTG CCT GGT GGA ACT GCT 545
Arg Ser Ile Gly Ser Val Gly Leu Tyr Val Pro Gly Gly Thr Ala

GTT TTG CCA TCT ACT GCT TTG ATG CTT GCT ATT CCT GCT CAG ATT 590
Val Leu Pro Ser Thr Ala Leu Met Leu Ala Ile Pro Ala Gln Ile

GCT GGA TGT AAA ACA GTT GTC CTC GCA ACT CCA CCA ACT AAG GAA 635
Ala Gly Cys Lys Thr Val Val Leu Ala Thr Pro Pro Thr Lys Glu

GGA AGC ATA TGT AAG GAG GTG CTG TAT TGT GCC AAG AGG GCT GGT 680
Gly Ser Ile Cys Lys Glu Val Leu Tyr Cys Ala Lys Arg Ala Gly

GTA ACT CAC ATT CTT AAA GCT GGT GGA GCA CAG GCT ATA GCT GCC 725
 Val Thr His Ile Leu Lys Ala Gly Gly Ala Gln Ala Ile Ala Ala
 ATG GCC TGG GGG ACA GAT TCT TGT CCT AAG GTT GAG AAG ATT TTT 770
 Met Ala Trp Gly Thr Asp Ser Cys Pro Lys Val Glu Lys Ile Phe
 GGT CCT GGG AAT CAG TAT GTT ACA GCT GCT AAG ATG ATT CTG CAA 815
 Gly Pro Gly Asn Gln Tyr Val Thr Ala Ala Lys Met Ile Leu Gln
 AAC AGC GAG GCA ATG GTT TCG ATT GAT ATG CCT GCT GGC CCT TCA 860
 Asn Ser Glu Ala Met Val Ser Ile Asp Met Pro Ala Gly Pro Ser
 GAA GTT CTT GTT ATC GCT GAT GAA CAT GCT AGT CCA GTT TAC ATT 905
 Glu Val Leu Val Ile Ala Asp Glu His Ala Ser Pro Val Tyr Ile
 GCA GCC GAC TTA CTT TCT CAG GCT GAG CAT GGT CCA GAT AGT CAG 950
 Ala Ala Asp Leu Leu Ser Gln Ala Glu His Gly Pro Asp Ser Gln
 GTT GTT CTT GTT GTT GTA GGC GAT GGT GTA AAT CTC AAA GCC ATC 995
 Val Val Leu Val Val Val Gly Asp Gly Val Asn Leu Lys Ala Ile
 GAA GAA GAA ATT GCT AAA CAA TGC AAA AGC CTT CCT AGA GGC GAG 1040
 Glu Glu Glu Ile Ala Lys Gln Cys Lys Ser Leu Pro Arg Gly Glu
 TTT GCT TCA AAA GCT CTA AGT CAC AGC TTC ACA GTA TTT GCT CGA 1085
 Phe Ala Ser Lys Ala Leu Ser His Ser Phe Thr Val Phe Ala Arg
 GAT ATG ATT GAG GCA ATA ACT TTC TCA AAC CTG TAT GCA CCT GAA 1130
 Asp Met Ile Glu Ala Ile Thr Phe Ser Asn Leu Tyr Ala Pro Glu
 CAC TTG ATC ATC AAT GTC AAA GAC GCT GAG AAA TGG GAG GGA CTG 1175
 His Leu Ile Ile Asn Val Lys Asp Ala Glu Lys Trp Glu Gly Leu
 ATA GAG AAC GCA GGT TCG GTT TTC ATA GGG CCG TGG ACT CCT GAG 1220
 Ile Glu Asn Ala Gly Ser Val Phe Ile Gly Pro Trp Thr Pro Glu
 AGT GTT GGT GAT TAC GCG AGC GGG ACA AAC CAC GTT CTT CCA ACG 1265
 Ser Val Gly Asp Tyr Ala Ser Gly Thr Asn His Val Leu Pro Thr
 TAC GGG TAT GCG AGA ATG TAC AGT GGC GTC TCT CTC GAC TCT TTC 1310
 Tyr Gly Tyr Ala Arg Met Tyr Ser Gly Val Ser Leu Asp Ser Phe
 CTG AAG TTC ATG ACT GTA CAG TCC TTG ACA GAG GAA GGT CTG CGA 1355
 Leu Lys Phe Met Thr Val Gln Ser Leu Thr Glu Glu Gly Leu Arg
 AAC CTT GGT CCG TAT GTT GCG ACT ATG GCT GAA ATT GAA GGT CTA 1400
 Asn Leu Gly Pro Tyr Val Ala Thr Met Ala Glu Ile Glu Gly Leu
 GAT GCA CAC AAG AGA GCC GTC ACT CTC AGA CTC AAG GAT ATC GAA 1445
 Asp Ala His Lys Arg Ala Val Thr Leu Arg Leu Lys Asp Ile Glu
 GCC AAA CAG ACC CAA ACA AAG TGA AATGAATGGC TGTCTTCATA 1489
 Ala Lys Gln Thr Gln Thr Lys *
 TTCAAATGAG GTGACATTGG TTTAAAGAGA TAATAATAAT AAGAATAATA 1539
 TAAGAGATGT TGTAACACTC TCTGTCATAA TCTGGATTTT CTTTCATTAT 1589
 TGAAATTGTA ATCCTTTCAC GCGT 1613



13ª. - Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por se obter uma proteína essencialmente pura tendo uma sequência de aminoácidos que é homóloga de pelo menos 70 por cento da referida sequência proteica de SEQ ID NO:1.

14ª. - Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por se obter uma proteína essencialmente pura tendo uma sequência de aminoácidos que é homóloga de pelo menos 80 por cento da referida sequência proteica de SEQ ID NO:1.

15ª. - Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por se obter uma proteína essencialmente pura tendo uma sequência de aminoácidos que é homóloga de pelo menos 90 por cento da referida sequência proteica de SEQ ID NO:1.

16ª. - Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por se obter uma proteína essencialmente pura tendo uma sequência de aminoácidos que é homóloga de pelo menos 99 por cento da referida sequência proteica de SEQ ID NO:1.

17ª. - Método para a produção de uma proteína vegetal recombinante purificada apresentando actividade de histidinol-desidrogenase, caracterizado por compreender:

(a) a transformação de um organismo hospedeiro adequado com um DNA recombinante compreendendo uma sequência de DNA codificadora de uma proteína com actividade de histidinol-desidrogenase;

(b) o isolamento da proteína a partir do sobrenadante de expressão.

18ª. - Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado por os organismos hospedeiros serem seleccionados do grupo constituído por células de bactérias, leveduras e insectos.

19ª. - Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado por se obter uma proteína vegetal essencialmente pura apresentando actividade de histidinol-desidrogenase.

20ª. - Método para produção de uma sequência de DNA essencialmente pura codificadora de uma proteína que tem actividade de histidinol-desidrogenase, caracterizado por compreender:

(a) a preparação de uma biblioteca genómica ou de cDNA a partir de um organismo fonte adequado usando um vector de clonagem adequado;

(b) a hibridação da biblioteca com uma molécula sonda;

(c) a identificação de hibridações positivas da sonda com os clones de DNA da biblioteca, ou seja clones potencialmente contendo a sequência de nucleótidos correspondendo à sequência de aminoácidos da histidinol-desidrogenase.

21ª. - Método para a produção de uma sequência de DNA essencialmente pura codificadora de uma proteína apresentando actividade de histidinol-desidrogenase, caracterizado por compreender:

(a) a preparação de DNA total a partir de uma biblioteca genómica ou de cDNA;

(b) a utilização do DNA do passo (a) como um molde para reacção de PCR com iniciadores representando porções de baixa

degenerescência da sequência de aminoácidos da histidinol-desidrogenase.

22ª. - Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 ou 21, caracterizado por se obter uma sequência de DNA essencialmente pura codificadora de uma proteína isolada de acordo com a reivindicação 1.

23ª. - Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 ou 21, caracterizado por se obter uma sequência de DNA essencialmente pura codificadora de uma proteína que apresenta actividade de histidinol-desidrogenase.

24ª. - Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 ou 21, caracterizado por se obter uma sequência de DNA essencialmente pura codificadora de uma proteína que apresenta actividade de histidinol-desidrogenase, em que a referida sequência de DNA é idêntica ou substancialmente homóloga da sequência de DNA de SEQ ID NO:1.

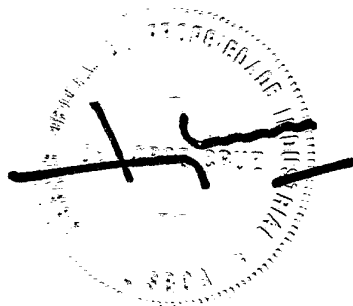
25ª. - Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado por se obter uma sequência de DNA essencialmente pura codificadora de uma proteína que apresenta actividade de histidinol-desidrogenase, em que a referida sequência de DNA é homóloga de pelo menos 60 por cento da sequência de DNA de SEQ ID NO:1.

26ª. - Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado por se obter uma sequência de DNA essencialmente pura codificadora de uma proteína que apresenta actividade de histidinol-desidrogenase, em que a referida sequência de DNA é homóloga de pelo menos 75 por cento da sequência de DNA de SEQ ID NO:1.

27ª. - Método de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por se obter uma sequência de DNA essencialmente pura codificadora de uma proteína que apresenta actividade de histidinol-desidrogenase, em que a referida sequência de DNA é homóloga de pelo menos 90 por cento da sequência de DNA de SEQ ID NO:1.

28ª. - Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado por se obter uma sequência de DNA essencialmente pura codificadora de uma proteína que apresenta actividade de histidinol-desidrogenase, em que a referida sequência de DNA é a sequência de DNA de SEQ ID NO:1.

29ª. - Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado por se obter uma sequência de DNA essencialmente pura codificadora de uma proteína que apresenta actividade de histidinol-desidrogenase, em que a referida sequência de DNA é a sequência de DNA de SEQ ID NO:2.

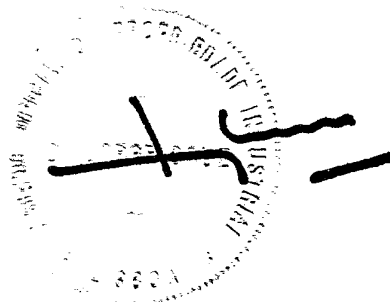


GGCACGAGGC TGTATGTTCC AGGGGGCACT GCAGTCTTGC CTTCAACTGC 50
ATTGATGCTT GCTGTGCCTG CACAGATTGC TGGATGCAAA ACTGTAGTTC 100
TTGCCACACC CCCTAGTCGT GATGGTAGCA TATGTAAGGA GGTTCTTTAC 150
TGTGCTAAAA AAGCTGGTGT TACACACATA CTAAAAGCTG GGGGAGCTCA 200
GGCAATCTCC GCTATGGCAT GGGGAACTGC ATCATGCCCA AAGGTTGAGA 250
AAATATTTGG TCCCGGCAAC CAGTATGTCA CAGCTGCTAA AATGATTCTT 300
CAGAACAGCG AAGCTATGGT CTCTATAGAC ATGCCTGCTG GCCCTTCAGA 350
AGTTCTGGTA ATCGCTGACA AATATGCCAA CCCAGTTCAT GTTGCCGCTG 400
ATCTGCTATC TCAGGCAGAA CATGGCCCAG ATAGTCAGGT TGTTCTAGTT 450
ATTGCGGGAG ATGGTGTTGA TTTAGCTGCC ACTGAAGCAG AAGTTAGCAA 500
GCAGTGTGAT GCTCTTCCTA GAGGCGACTT TGCTTCCTAA GCACTTGGCC 550

ACAGTTTCAC TGTGTTTGCC AGAGATATGG CTGAGGCATT ATCGTTCTCA 600
AATATGTATG CTCCTGAGCA TTTGATCATC AATGTAAAGG ATGCTGAGCA 650
ATGGGAGGAG CTCATCGAGA ATGCAGGGTC AGTTTTCTTG GGACAATGGA 700
CCCCCGAGAG CGTCGGTGAC TACGCTAGTG GGACGAACCA CGTCCTCCCA 750
ACCTACGGTT ACGCGAGGAT GTACAGCGGT GTGTCGCTGA ATTCTTTCCT 800
CAAGTACATC ACTGTTCAAT CCCTGACTGA AGNAGGGCTG AGAAGGCTGG 850
GTCCCTACGT CGCAAAGATG GCAGAAGTCG AAGGCCTAGA AGCGCACAAG 900
CGAGCTGTTA CCCTCAGACT GCAAGAGATC GAAGCCACTG TAACTGTTTA 950
AACTGTTAAC ATGGTCTGTT GTGCCAGTCT ATTTGATGCT TGGGAACTGA 1000
TATTTTTCTT AATTCTTATC GGATGGGACT TGCCAGAGTT TAAGGTGAAT 1050
ACGAAGCTGT TTCATGGAAT AATGCTACTT ATGTCGATCC GTTAAATGAA 1100
TAAACTGTG AGTACAGTCT CTAAAAAAA AAAAAAA 1137

30ª. - Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado por se obter uma sequência de DNA essencialmente pura codificadora de uma proteína que apresenta actividade de histidinol-desidrogenase, em que a referida sequência de DNA é a sequência de DNA de SEQ ID NO:3.

GGCACGAGAT	GTAAGGAGGT	TCTTTACTGT	GCCAAAAAAG	CTGGTGTTAC	50
ACACATACTA	AAAGCTGGGG	GAGCTCAGGC	AATCTCCGCT	ATGGCATGGG	100
GAACCGCATC	ATGCCCAAAG	GTTGAGAAAA	TATTTGGTCC	TGGCAACCAG	150
TATGTCACAG	CTGCTAAAAT	GATTCTTCAG	AACAGCGAAG	CTATGGTCTC	200
TATAGACATG	CCTGCTGGCC	CTTCAGAAGT	TCTGGTAATT	GCTGACAAAT	250
ATGCCAACCC	AGTTCATGTT	GCCGCTGATC	TGCTATCTCA	GGCAGAACAT	300
GGCCCAGATA	GTCAGGTTGT	TCTAGTTATT	GCTGGAGATG	GTGTTGATTT	350
AGGTGCCATT	GAAGCAGAAG	TTAGCAAGCA	GTGCGATGCT	CTTCCTAGAG	400
GCGACTTTGC	TTCCAAAGCA	CTTGGCCACA	GTTTCACTGT	GTTTGNCAGA	450
GATATGGTTG	AGGNATTATC	GTTCTCAAAT	ATGTATGCTC	CTGAGCATTT	500
GATCATCAAC	GTAAAGGATG	CTGAGCAATG	GGAGGAGCTC	ATCGAGAACG	550
CAGGGTCAGT	TTTCTTGGGA	CAATGGACCC	CCGAGAGCGT	GGGTGACTAT	600



GCCAGTGGGA CGAACCACGT CCTCCCAACC TACGGTTACG CGAGGATGTA 650
CAGCGGTGTG TCGCTGAACT CTTTCCTCAA GTACATCACT GTTCAATCCC 700
TGAAGTGAAGA AGGGCTGAGA AGGCTGGGCC CCTACGTCGC AAAGATGGCA 750
GAAGTCGAAG GGCTAGAAGC GCACAAGCGA GCTGTTACCC TCAGACTGCA 800
AGAGGTCGAA GCCACTGTAA CTGTGTAAAC TGTTAGCATG GTCTGTTGTG 850
CCAGTCTATT TGATGCTTGG GGACTGATAT TTTTCTTCAT TTTTATCGGA 900
TGGAAC TTGC CAGAGTTTAA GGTGAAGAAT ACGAAGCTGT TTCATGGAAT 950
AATGCTACTT ATGTCGATCT GTTAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAA 995

31ª. - Ensaio para identificar inibidores da atividade de histidinol-desidrogenase, caracterizado por compreender:

(a) a incubação de uma primeira amostra de histidinol-desidrogenase e do seu substrato;

(b) a medição de uma reactividade não inibida da histidinol-desidrogenase do passo (a);

(c) a incubação de uma primeira amostra de histidinol-desidrogenase e do seu substrato na presença de uma segunda amostra compreendendo um composto inibidor;

(d) a medição de uma reactividade inibida da histidinol-desidrogenase do passo (c); e

(e) a comparação da reactividade inibida com a reactividade não inibida da histidinol-desidrogenase.



32ª. - Ensaio para identificar mutantes da histidinol-desidrogenase resistentes a inibidores, caracterizado por compreender:

(a) a incubação de uma primeira amostra de histidinol-desidrogenase e do seu substrato na presença de uma segunda amostra compreendendo um inibidor de histidinol-desidrogenase;

(b) a medição de uma reactividade não mutagenizada da histidinol-desidrogenase do passo (a);

(c) a incubação de uma primeira amostra de uma histidinol-desidrogenase mutagenizada e do seu substrato na presença de uma segunda amostra compreendendo um inibidor de histidinol-desidrogenase;

(d) a medição de uma reactividade mutagenizada da histidinol-desidrogenase mutagenizada do passo (c); e

(e) a comparação da reactividade mutagenizada relativamente à reactividade não mutagenizada da histidinol desidrogenase.

33ª. - Planta transgénica, caracterizada por ter sido transformada de modo a conter DNA codificador de um ou mais mutantes da histidinol-desidrogenase resistentes a inibidores identificados de acordo com o método da reivindicação 32.

34ª. - Método para a produção de uma planta transgénica contendo DNA codificador de um ou mais mutantes da histidinol-desidrogenase resistentes a inibidores identificados de acordo com o método da reivindicação 32, caracterizado por se transformar a referida planta com uma molécula de DNA recombinante

compreendendo a sequência de DNA codificadora de um ou mais mutantes da histidinol-desidrogenase resistentes a inibidores.

35ª. - Método para a preparação de uma composição herbicida, caracterizado por compreender a mistura homogênea de um inibidor da actividade histidinol-desidrogenase identificado de acordo com o método da reivindicação 32 numa quantidade eficaz inibidora da histidinol-desidrogenase, com um ou mais veículos e/ou adjuvantes adequados habitualmente utilizados em formulações agrícolas.

36ª. - Método para o controle de ervas daninhas numa população de uma seara com interesse, caracterizado por compreender a aplicação de uma composição herbicida preparada de acordo com a reivindicação 36, contendo um inibidor da actividade histidinol-desidrogenase numa quantidade eficaz inibidora da histidinol-desidrogenase, às referidas searas, em que as referidas searas são de uma planta transgénica contendo DNA codificador de um ou mais mutantes da histidinol-desidrogenase resistente a inibidores.

37ª. - Método para a utilização da sequência de DNA preparada de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 29 ou seus fragmentos como sonda de hibridação num processo de identificação de outras sequências de DNA de uma origem homóloga ou heteróloga codificadoras de uma proteína tendo actividade de histidinol-desidrogenase, caracterizado por compreender:

a) a preparação de uma biblioteca genómica ou de cDNA a partir de um organismo dador;

b) a marcação de uma molécula sonda com uma marca adequada;



c) a sondagem da biblioteca do passo (a) com a molécula sonda do passo (b) numa reacção de hibridação; e

d) a identificação do clone da biblioteca que hibridou com a molécula sonda.

38ª. - Método de acordo com a reivindicação 37, caracterizado por as referidas sequências de DNA ou seus fragmentos, serem utilizadas como uma marca de RFLP.

Lisboa, 12 de Setembro de 1991

J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A 3.º
1200 LISBOA

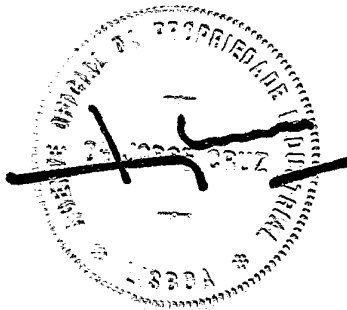
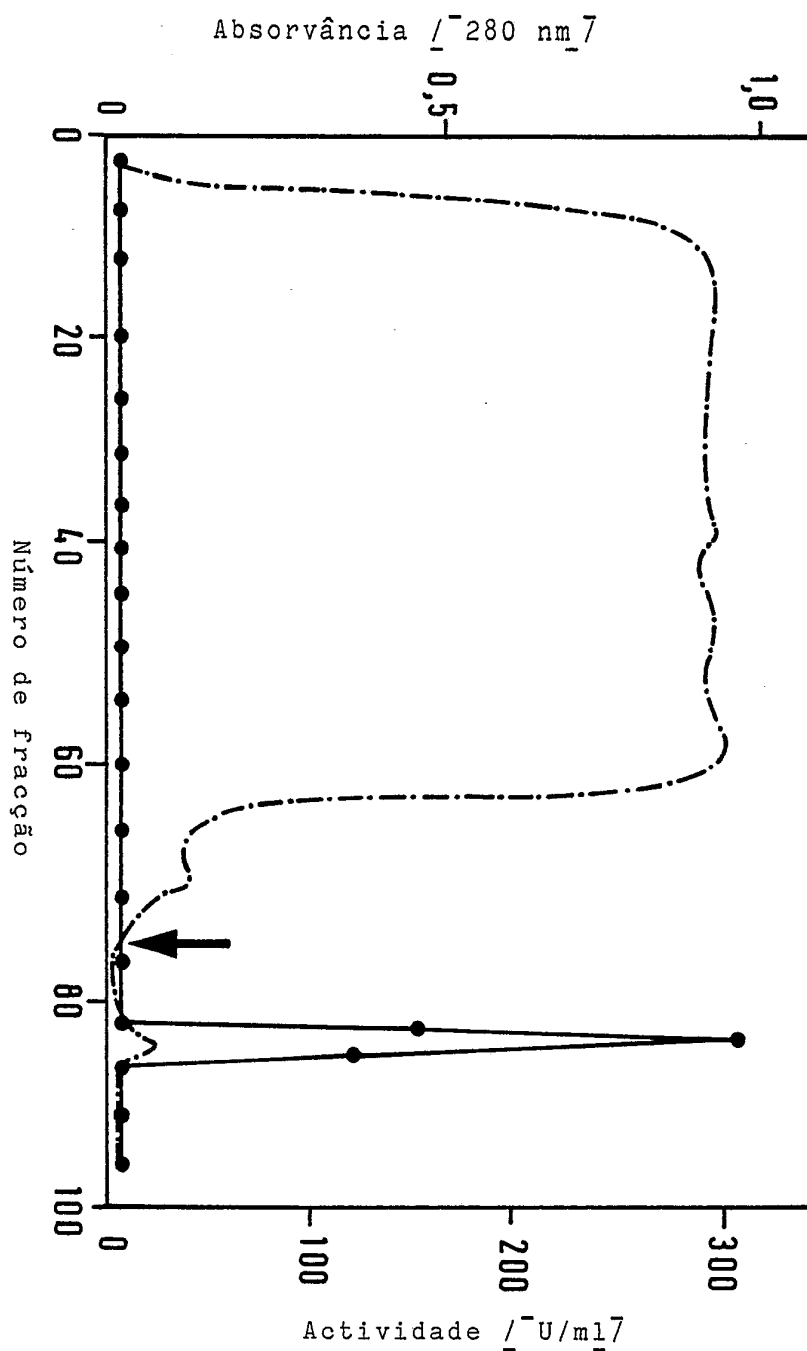


Fig. 1

Cromatografia de afinidade em histidinol - Sepharose - 4B



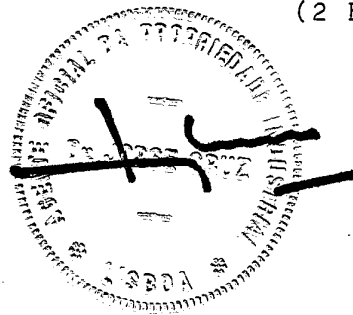


Fig. 2

Dependência de actividade de histidinol
desidrogenase relativamente ao pH

