



HU000227706B1

(19) **HU****MAGYARORSZÁG**  
**Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala**(11) Lajstromszám: **227 706**(13) **B1**

## SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 03 03214**(22) A bejelentés napja: **2002. 02. 28.**(40) A közzététel napja: **2003. 12. 29.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi  
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2011. 12. 28.**(51) Int. Cl.: **C07K 14/79** (2006.01)**C12N 1/21** (2006.01)**C12N 9/00** (2006.01)**C12N 9/02** (2006.01)**C12N 9/10** (2006.01)**C12N 15/82** (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

**PCT/US 02/06310**

(87) A nemzetközi közzétételi szám:

**WO 02068607**

|                                                                                                                                                                                         |                                                                                                         |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (30) Elsőbbségi adatok:<br><b>09/797,238</b> <b>2001. 02. 28.</b> <b>US</b>                                                                                                             | (73) Jogosult(ak):<br><b>Board of Regents of the University of<br/>Nebraska, Lincoln, Nebraska (US)</b> |
| (72) Feltaláló(k):<br><b>Weeks, Donald P., Lincoln, Nebraska (US)</b><br><b>Wang, Xiao-Zhuo, Chapel Hill, North Carolina (US)</b><br><b>Herman, Patricia L., Waverly, Nebraska (US)</b> | (74) Képviselő:<br><b>dr. Pethő Árpád, DANUBIA Szabadalmi és<br/>Védjegy Iroda Kft., Budapest</b>       |

(54) **Eljárások és anyagok dicamba-lebontó transzgenikus organizmusok előállítására**

(57) Kivonat

A találmány tárgyát dicamba-herbicidet lebontani képes transzgenikus organizmusok képezik, például olyan transzgenikus növények, amelyek dicambára toleránsakká lettek alakítva. A találmány tárgyát képezik dicamba-lebontó enzimek is, valamint dicamba-lebontó enzimeket kódoló DNS-molekulák és DNS-konstrukciók.

A találmány tárgyát képezik továbbá eljárások gyomnövények elpusztítására, dicambatoleráns transzgenikus növények termesztésére szolgáló szántóföldön, és eljárások dicamba eltávolítására olyan anyagokból, amelyek szennyezésként tartalmazzák azt (bioremediáció). A találmány tárgyát képezik továbbá eljárások transzformánsok szelektálására dicamba-toleranciára vagy a dicamba-lebontás eredményeként keletkező 3,6-diklór-szalicilsav fluoreszcenciájának detektálására alapozva.

A találmány szerinti megoldás alkalmas új, hatékony növénytermesztési eljárások kidolgozására és a környezet biológiai regenerálására.

## Eljárások és anyagok dicamba-lebontó, transzgenikus organizmusok előállítása

A találmány tárgyát dicamba-herbicidet lebontani képes transzgenikus organizmusok képezik, például olyan transzgenikus növények, amelyek dicambára toleránssá lettek alakítva. A találmány tárgyát képezik dicamba-lebontó enzimek is, valamint dicamba-lebontó enzimeket kódoló DNS-molekulák és DNS-konstrukciók. A találmány tárgyát képezik továbbá eljárások gyomnövények elpusztítására, dicamba-toleráns transzgenikus növények termesztésére szolgáló szántóföldön, és eljárások dicamba eltávolítására olyan anyagokból, amelyek szennyezésként tartalmazzák azt (bioremediáció). A találmány tárgyát képezik továbbá eljárások transzformánsok szelektálására dicamba-toleranciára vagy a dicamba-lebontás eredményeként keletkező 3,6-diklór-szalícilsav fluoreszcenciájának detektálására alapozva.

Herbicideket rutinszerűen alkalmaznak a mezőgazdasági termelésben. Hatékonyságukat gyakran az alapján határozzák meg, hogy milyen mértékben képesek elpusztítani a haszonnövények termesztésére szolgáló szántóföldön nőtt gyomokat, és az értékesíthető haszonnövénynek a herbicidre mutatott toleranciája alapján. Ha az értékesíthető haszonnövény nem toleráns a herbicidre, a herbicid tönkreteszi az értékesíthető haszonnövény termőképességét vagy teljesen elpusztítja azt. Ezzel ellentétben, ha a herbicid nem elég erős, túl sok gyom növekedését teszi lehetővé a haszonnövények termesztésére szolgáló szántóföldön, amely viszont csökkenti az értékesíthető haszonnövény termőképességét. Ezért kívánatos olyan, gazdaságilag jelentős növények előállítása, amelyek herbicidekre toleránsak. A víz és mezőgazdasági területek környezeti minőségének megóvása céljából is kívánatos, hogy kifejlesszünk herbicidek lebontására szolgáló technológiákat azokra az esetekre, ha az véletlenül kiömlik, vagy azokra az esetekre, ha a föld vagy a víz vártnál nagyobb mértékben szennyeződik.

Herbicideket és más xenofób vegyületeket inaktiváló enzimeket kódoló géneket már sokféle prokarióta és eukarióta organizmusból izoláltak. Néhány esetben ezeket a géneket genetikailag manipulálták növényekben való sikeres expresszió céljából. Ezzel a megközelítéssel olyan növényeket fejlesztettek ki, amelyek herbicidekre toleránsak, közelebbről 2,4-diklór-fenoxi-ecetsavra [Willmitzer, Bio/Technology 7, 811-816 (1989)], bromoxynilre [Stalker és mtsai., Science 242, 419-423 (1988); kereskedelmi név: Buctril], glifozátra [Comai és mtsai., Nature 317, 741-744 (1985); kereskedelmi név: Round-Up] és foszfino-tricinre [De Block és mtsai., EMBO J. 6, 2513-2518 (1987); kereskedelmi név: Basta].

A "dicamba"-t (kereskedelmi név: Banvel) herbicidként alkalmazzák egynyári és évelő, széles lomblevelű gyomok és néhány fűféle-gyom kiirtására, amelyek kukorica, círok, gabonafélék között, legelőn, kaszálón, szabad legelőn, cukornád, spárga, gyepek és magért termesztett fű között nőnek, azok megjelenése előtt vagy után [lásd "Crop Protection Reference", 1803-1821. old., Chemical & Pharmaceutical Press, Inc., New York, NY, 11. kiadás (1995)]. Sajnos a dicamba több, kereskedelmileg fontos haszonnövényt károsíthat (például babot, szójababot, gyapotot, borsót, burgonyát, napraforgót, paradicsomot, dohányt és gyümölcsfákat), diszfákat és dísznövényeket, és más széles lomblevelű növényt, ha érintkezésbe kerül azokkal (hivatkozás ugyanott). A dicamba kémiaiailag stabil, és néha tartósan a környezetben maradhat.

Dicamba a benzoésav-herbicidek osztályába tartozik. Feltételezések szerint benzoésav-herbicidekre, beleértve dicambára toleráns növényeket 1-amino-ciklopropán-1-karbonsav (ACC) szintetáz kódoló antiszensz gén, ACC oxidáz antiszensz gén, ACC deamináz-gén vagy ezek kombinációjának növénybe való beépítésével lehet előállítani [lásd 2,165,036. sz. kanadai szabadalmi leírás, közzétéve 1996. június 16.]. Azonban ebben a szabadalmi leírásban nincsenek bemutatva olyan kísérleti adatok, amelyek igazolják ezt a toleranciát.

Ismeretesek dicambát metabolizáló baktériumok [lásd 5,445,962. sz. USA-beli szabadalmi leírás; Krueger és mtsai., J. Agric. Food Chem. 37, 534-538 (1989); Cork és Krueger, Adv. Appl. Microbiol. 38, 1-66 (1991); Cork és Khalil, Adv. Appl. Microbiol. 40, 289-320 (1995)]. Feltételezések szerint ezen baktériumokból dicamba metabolizmusáért felelős, specifikus géneket lehet izolálni, és dicamba-rezisztens növények és más organizmusok előállítására lehet azokat alkalmazni [lásd ugyanott; Yang és mtsai., Anal. Biochem. 219, 37-42 (1994)]. Azonban a jelen találmány kidolgozása előtt még nem azonosítottak vagy izoláltak ilyen géneket.

A találmány tárgya izolált és legalább részlegesen tisztított dicamba-lebontó O-demetiláz, izolált és legalább részlegesen tisztított dicamba-lebontó oxigenáz, izolált és legalább részlegesen tisztított dicamba-lebontó ferredoxin, valamint izolált és legalább részlegesen tisztított dicamba-lebontó reduktáz, valamennyi a lentebb definiáltak és leírtak szerint.

A találmány tárgyát képezi olyan izolált DNS-molekula is, amely dicamba-lebontó oxigenázt kódoló DNS-szekvenciát tartalmaz, olyan izolált DNS-molekula, amely dicamba-lebontó ferredoxint kódoló DNS-szekvenciát tartalmaz és olyan izolált DNS-molekula, amely dicamba-lebontó reduktázt kódoló DNS-szekvenciát tartalmaz. A találmány tárgyát képezi továbbá olyan DNS-konstrukció, amely dicamba-lebontó oxigenázt kódoló DNS-szekvenciát, dicamba-lebontó ferredoxint kódoló DNS-szekvenciát vagy dicamba-lebontó reduktázt kódoló

DNS-szekvenciát tartalmaz úgy, hogy az egyes kódoló DNS-szekvenciák expressziós szabályzó szekvenciákhoz működőképesen vannak kapcsolva. A találmány tárgyát képezi továbbá olyan DNS-konstrukció, amely dicamba-lebontó oxigenázt kódoló DNS-szekvenciát, dicamba-lebontó ferredoxint kódoló DNS-szekvenciát és dicamba-lebontó reduktázt kódoló DNS-szekvenciát tartalmaz úgy, hogy az egyes kódoló DNS-szekvenciák expressziós szabályzó szekvenciákhoz működőképesen vannak kapcsolva.

A találmány tárgyát képezi továbbá a fentebb definiált bármelyik DNS-konstrukció, amely olyan DNS-szekvenciát is tartalmaz, amely a dicamba-lebontó enzime(ke)t növényi sejt vagy mikroorganizmus organellumaihoz (kloroplasztiszhoz és/vagy mitokondriumhoz) képes célba juttatni.

A találmány tárgyát képezi továbbá olyan transzgenikus gazdasejt, amely dicamba-lebontó oxigenázt kódoló DNS-t, dicamba-lebontó ferredoxint kódoló DNS-t vagy dicamba-lebontó reduktázt kódoló DNS-t tartalmaz úgy, hogy az egyes DNS-ek expressziós szabályzó szekvenciákhoz működőképesen vannak kapcsolva. Továbbá, a találmány tárgyát képezi olyan transzgenikus gazdasejt, amely dicamba-lebontó oxigenázt kódoló DNS-t és dicamba-lebontó ferredoxint kódoló DNS-t, dicamba-lebontó reduktázt kódoló DNS-t, vagy dicamba-lebontó ferredoxint kódoló DNS-t és dicamba-lebontó reduktázt kódoló DNS-t tartalmaz úgy, hogy az egyes DNS-ek expressziós szabályzó szekvenciákhoz működőképesen vannak kapcsolva. A találmány néhány előnyös megvalósítási módja szerint, a DNS olyan tranzitpeptidet kódoló DNS-szekvenciát is tartalmazhat, amely a dicamba-lebontó enzim(ek)et növényi sejt vagy mikroorganizmus organellumaihoz (kloroplasztiszhoz és/vagy mitokondriumhoz) képes célba juttatni. A transzgenikus gazdasejt lehet növényi sejt vagy prokarióta vagy eukarióta mikroorganizmus.

A találmány tárgyát képezi egy vagy több, olyan sejtet tartalmazó transzgenikus növény vagy növényi rész, amely dicamba-lebontó oxigenázt kódoló DNS-t, dicamba-lebontó ferredoxint kódoló DNS-t vagy dicamba-lebontó reduktázt kódoló DNS-t tartalmaz úgy, hogy az egyes DNS-ek expressziós szabályzó szekvenciákhoz működőképesen vannak kapcsolva. A találmány tárgyát képezi továbbá egy vagy több olyan sejtet tartalmazó transzgenikus növény vagy növényi rész, amely dicamba-lebontó oxigenázt kódoló DNS-t és dicamba-lebontó ferredoxint kódoló DNS-t, dicamba-lebontó reduktázt kódoló DNS-t, vagy dicamba-lebontó ferredoxint kódoló DNS-t és dicamba-lebontó reduktázt kódoló DNS-t tartalmaz úgy, hogy az egyes DNS-ek expressziós szabályzó szekvenciákhoz működőképesen vannak kapcsolva. A találmány bizonyos előnyös megvalósítási módjai szerint, a DNS továbbá olyan tranzitpeptidet

kódoló DNS-szekvenciát tartalmaz, amely a dicamba-lebontó enzime(ke)t növényi sejt organelumaihoz képes célba juttatni. A transzgenikus növény vagy növényi rész előnyösen dicambára toleráns, vagy dicamba-toleranciájának mértéke megnövekedett dicamba-lebontó enzim(ek) expressziójának eredményeként.

5 A találmány tárgyát képezi eljárás is gyomok elpusztítására transzgenikus, dicamba-toleráns növények termesztésére szolgáló szántóföldön. Az eljárásban akkora mennyiségű dicambát alkalmazunk a szántóföldön, amely hatékony gyomok elpusztítására.

A találmány tárgyát képezik eljárások dicambát tartalmazó anyag dekontaminálására. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, az eljárásban hatásos mennyiségű, transzge-  
10 nikus dicamba-lebontó mikroorganizmust alkalmazunk az anyagon. A találmány egy másik előnyös megvalósítási módja szerint, az eljárásban hatásos mennyiségű dicamba-lebontó O-demetilázt alkalmazunk, vagy hatásos mennyiségű dicamba-lebontó oxigenáz, dicamba-lebontó ferredoxin és dicamba-lebontó reduktáz kombinációját alkalmazzuk az anyagon.

A találmány tárgyát képezi eljárás transzformált növényi sejtek és transzformált növé-  
15 nyek szelekciójára is, szelekciós markerként dicamba-toleranciát alkalmazva. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, az eljárásban egy növényi sejtpopulációból legalább néhány növényi sejtet transzformálunk, így azok dicambára toleránsak, és az eredményül kapott növényi sejtpopulációt dicambát tartalmazó, tenyésztési táptalajon növesztve a dicamba koncentrációját úgy választjuk meg, hogy a transzformált növényi sejtek növekedjenek és a nem-  
20 transzformált növényi sejtek ne növekedjenek. A találmány egy másik előnyös megvalósítási módja szerint, az eljárásban dicambát alkalmazunk olyan növényi populációban, amelyről feltételezzük, hogy tartalmaznak transzformált növényeket, és az alkalmazott dicamba mennyiségét úgy választjuk meg, hogy transzformált növények növekedjenek, és nem-transzformált növények növekedése gátolva legyen.

25 Végül, a találmány tárgyát képezi eljárás transzformált gazdasejtek, intakt organizmusok és organizmus-részek szelektálására vagy szkrinelésére. Az eljárásban előállítunk olyan gazdasejt-populációt, intakt organizmusokat vagy organizmus-részeket, amelyekről feltételezzük, hogy tartalmaznak transzformált gazdasejteket, intakt organizmusokat vagy organizmus-részeket, és meghatározzuk 3,6-diklór-szalicilsavnak tulajdonítható fluoreszcencia jelenlétét  
30 vagy mértékét. A 3,6-diklór-szalicilsav transzformált gazdasejtekben, intakt organizmusokban vagy organizmus-részekben képződik a dicamba lebontásának eredményeként, de nem képződik nem-transzformált gazdasejtekben, intakt organizmusokban vagy organizmus-részekben.

1. ábra. A javasolt elektrontranszport vázlata dicamba O-demetilázra. Elektron szállítás történik a NADH-ról egymás követően reduktáz<sub>DIC</sub>-re, ferredoxin<sub>DIC</sub>-re és azután oxigenáz<sub>DIC</sub>-re. Az oxigén és a dicamba-szubsztrát reakcióját oxigenáz<sub>DIC</sub> katalizálja, miközben 3,6-diklór-szalicilsav keletkezik. ox, oxidált; red, redukált.

2. ábra. Dicamba O-demetilázban lévő ferredoxin-komponens levezetett aminosav-szekvenciájának összehasonlítása ferredoxinok adrenodoxin-családtagjainak aminosav-szekvenciájával. Jelölések a 2. ábrán: ferr di6 = *Pseudomonas maltophilia* DI-6-ból származó dicamba O-demetiláz ferredoxin-komponense (5. azonosítószámú szekvencia); fer6 rhoc = *Rhodobacter capsulatus*-ból származó ferredoxin (10. azonosítószámú szekvencia); fer cauc = *Caulobacter crescentus*-ból származó ferredoxin [11. azonosítószámú szekvencia]; thcc rhoc = *Rhodococcus erythropolis*-ből származó ferredoxin [12. azonosítószámú szekvencia]; putx psepu = *Pseudomonas putida*-ból származó ferredoxin (13. azonosítószámú szekvencia); terp pscsp = *Pseudomonas* fajból származó ferredoxin (14. azonosítószámú szekvencia). A 2. ábrán továbbá az 1-3. számozás a bakteriális ferredoxinok adrenodoxin-családjának három konzervatív motívumát jelöli.

3. ábra. Dicamba O-demetilázban lévő két reduktáz-komponens levezetett aminosav-szekvenciájának összehasonlítása FAD-függő piridin-nukleotid reduktázok családtagjainak aminosav-szekvenciájával. Jelölések a 3. ábrán: red1 di6 = *P. maltophilia* DI-6-ból származó dicamba O-demetiláz reduktáz-komponense (7. azonosítószámú szekvencia); red2 di6 = *P. maltophilia* DI-6-ból származó dicamba O-demetiláz reduktáz-komponense (9. azonosítószámú szekvencia); AJ002606 = *Sphingomonas* fajból származó reduktáz (15. azonosítószámú szekvencia); thcd rhoer = *R. erythropolis*-ből származó reduktáz (16. azonosítószámú szekvencia); cama psepu = *P. putida*-ból származó reduktáz (17. azonosítószámú szekvencia); tera pscsp = *Pseudomonas* fajból származó reduktáz (18. azonosítószámú szekvencia). A 3. ábrán továbbá az 1-5. számozás a FAD-függő piridin-nukleotid reduktázok öt konzervatív motívumát jelöli.

Korábban végzett vizsgálatokban kimutatták [Cork és Kreuger, *Advan. Appl. Microbiol.* **36**, 1-56 és Yang és mtsai., *Anal. Biochem.* **219**, 37-42 (1994)], hogy a *Pseudomonas maltophilia* talajbaktérium DI-6-törzse képes megszüntetni a dicamba herbicid-aktivitását egyetlen reakciólépésben, amelyben a dicamba (3,6-diklór-2-metoxi-benzoészav) 3,6-diklór-szalicilsavvá (3,6-DCSA) alakul. A 3,6-DCSA nem rendelkezik herbicid-aktivitással, és kimutatták, hogy nem fejt ki semmilyen káros hatást növényekre. Továbbá a 3,6-DCSA-t könnyen lebontja a talajban lévő normál baktériumflóra.

A leírásban ismertetett kísérletek igazolják Yang és munkatársai [lásd ugyanott] hipotézisét, amely szerint O-demetiláz felelős a dicamba 3,6-DCSA-vá alakításáért *P. maltophilia* DI-6-törzs alkalmazása esetén, és kimutatták, hogy az O-demetiláz egy három komponensből álló enzimrendszer, amely reduktázból, ferredoxinból és oxigenázból áll. Az 1. és 3. példában részletesen leírjuk a *P. maltophiliaból* származó O-demetiláz és három komponensének izolálását, tisztítását és jellemzését. A dicamba O-demetiláz három komponense által katalizált reakció reakcióvázlatát bemutatjuk az 1. ábrán. Az 1. ábrán bemutatottak szerint, elektronok vándorolnak a NADH-ról reduktázból és ferredoxinból álló rövid elektrontovábbító láncon a terminális oxigenázig, amely katalizálja a dicamba oxidációját 3,6-DCSA-t előállítva.

A találmány első előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát izolált és legalább részlegesen tisztított, dicamba-lebontó enzimek képezik. A leírásban az „izolált” kifejezés azt jelenti, hogy az enzimeket legalább azokból a sejtekből eltávolítjuk, amelyekben termelődtek (azaz abból a sejtizátumból, amely tartalmazza azt). A leírásban „legalább részlegesen tisztított” kifejezés azt jelenti, hogy azokat legalább részlegesen elkülönítjük a sejtizátum más komponenseitől. Előnyösen az enzimeket elegendő annyira megtisztítani, hogy az enzimpreparátumok legalább körülbelül 70%-osan homogének legyenek.

A találmány tárgyát különösen izolált és legalább részlegesen tisztított dicamba-lebontó O-demetiláz képezi. A leírásban a „dicamba-lebontó O-demetiláz” kifejezés dicamba-lebontó oxigenáz, dicamba-lebontó ferredoxin és dicamba-lebontó reduktáz kombinációját jelenti, valamennyit lentebb definiáljuk.

A találmány tárgyát képezi izolált és legalább részlegesen tisztított dicamba-lebontó oxigenáz is. A leírásban a „dicamba-lebontó oxigenáz” *P. maltophilia* DI-6-törzsből tisztított oxigenázt jelent, és olyan oxigenázokat, amelyek az említett *P. maltophiliaból* származó oxigenázzal legalább körülbelül 65%-ban homológ (és előnyösen azonos), és előnyösebben legalább körülbelül 75%-ban homológ (és előnyösen azonos), és előnyösebben legalább körülbelül 85%-ban homológ (és előnyösen azonos), sőt, még előnyösebben legalább körülbelül 95%-ban homológ aminosav-szekvenciával rendelkeznek, valamint amelyek képesek részt venni dicamba lebontásában. „Dicamba-lebontó oxigenázok” közé tartoznak olyan mutáns oxigenázok, amelyek *P. maltophiliaból* származó oxigenáz aminosav-szekvenciájával rendelkeznek, amelyekben *P. maltophiliaból* származó oxigenáz szekvenciájához képest egy vagy több aminosav hozzáadása, delécioja vagy szubsztitúciója történt. Ilyen oxigenázok lehetnek az oxigenáz enzimatikusan aktív fragmensei, valamint olyan oxigenázok, amelyek *P. maltophiliaból* származó oxigenázzal egy adott mértékben homológok vagy azonosak. Dicamba-lebontó oxige-

názok aktivitását az 1. és 3. példában leírtak szerint lehet meghatározni.

A találmány tárgyát képezi továbbá izolált és legalább részlegesen tisztított dicamba-lebontó ferredoxin. A leírásban a „dicamba-lebontó ferredoxin” *P. maltophilia* DI-6-törzsből tisztított ferredoxint jelent, és olyan ferredoxinokat, amelyek az említett *P. maltophiliaból* származó ferredoxinnal legalább körülbelül 65%-ban homológ (és előnyösen azonos), és előnyösebben legalább körülbelül 75%-ban homológ (és előnyösen azonos), és előnyösebben legalább körülbelül 85%-ban homológ (és előnyösen azonos), sőt, még előnyösebben legalább körülbelül 95%-ban homológ aminosav-szekvenciával rendelkeznek, valamint amelyek képesek részt venni dicamba lebontásában. „Dicamba-lebontó ferredoxinok” közé tartoznak olyan mutáns ferredoxinok, amelyek *P. maltophiliaból* származó ferredoxin aminosav-szekvenciájával rendelkeznek, de amelyekben a *P. maltophiliaból* származó ferredoxin szekvenciájához képest egy vagy több aminosav hozzáadása, delécioja vagy szubsztitúciója történt. Ilyen ferredoxinok lehetnek a ferredoxin enzimatikusan aktív fragmensei, valamint olyan ferredoxinok, amelyek *P. maltophiliaból* származó oxigenázzal egy adott mértékben homológok vagy azonosak. Dicamba-lebontó ferredoxinok aktivitását az 1. és 3. példában leírtak szerint lehet meghatározni.

Végül, a találmány tárgyát képezi izolált és legalább részlegesen tisztított dicamba-lebontó reduktáz. A leírásban a „dicamba-lebontó reduktáz” *P. maltophilia* DI-6-törzsből tisztított reduktázt jelent, és olyan reduktázokat, amelyek az említett *P. maltophiliaból* származó reduktázzal legalább körülbelül 65%-ban homológ (és előnyösen azonos), és előnyösebben legalább körülbelül 75%-ban homológ (és előnyösen azonos), és előnyösebben legalább körülbelül 85%-ban homológ (és előnyösen azonos), sőt, még előnyösebben legalább körülbelül 95%-ban homológ aminosav-szekvenciával rendelkeznek, valamint amelyek képesek részt venni dicamba lebontásában. „Dicamba-lebontó reduktázok” közé tartoznak olyan mutáns reduktázok, amelyek *P. maltophiliaból* származó reduktáz aminosav-szekvenciájával rendelkeznek, de amelyekben a *P. maltophiliaból* származó reduktáz szekvenciájához képest egy vagy több aminosav hozzáadása, delécioja vagy szubsztitúciója történt. Ilyen reduktázok lehetnek a reduktáz enzimatikusan aktív fragmensei, valamint olyan reduktázok, amelyek *P. maltophiliaból* származó oxigenázzal egy adott mértékben homológok vagy azonosak. Dicamba-lebontó reduktázok aktivitását az 1. és 3. példában leírtak szerint lehet meghatározni.

Aminosav-szekvenciahomológia mértékének meghatározására szolgáló módszerek szakember számára ismertek. Például Genetics Computing Group (GCG) szoftvercsomagjának FASTA-programját (University of Wisconsin, Madison, WI) lehet alkalmazni

különböző fehérje-adatbázisokból, például „Swiss Protein Database”-ból származó szekven-  
ciák összehasonlítására.

A találmány szerinti dicamba-lebontó enzimeket az 1. és 3. példában leírtak szerint le-  
het izolálni és tisztítani *P. maltophilaból* vagy más organizmusokból. Alkalmas, más organiz-  
musok lehetnek például *P. maltophilia* DI-6-törzstől különböző baktériumok. Számos ilyen  
baktériumtörzs ismeretes, például sok talajbaktérium, valamint édesvízi baktérium, lásd például  
5,445,962. sz. USA-beli szabadalmi leírás; Krueger és mtsai., J. Agric. Food Chem. 37, 534-  
538 (1989); Cork és Krueger, Adv. Appl. Microbiol. 38, 1-66 (1991); Cork és Khalil, Adv.  
Appl. Microbiol. 40, 289-320 (1995). Dicamba-lebontó baktériumok (azaz olyan baktériumok,  
amelyek dicamba-t használnak szénforrásként) találhatók sok baktérium-nemzetségben, például  
*Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Aeromonas*, *Xanthomonas*, *Alcaligenis* és *Moraxella*. Más,  
dicamba-lebontó baktériumtörzseket ezekhez a törzsekhez hasonlóan, szakember által ismert  
módszerekkel lehet izolálni.

A találmány szerinti dicamba-lebontó enzimeket azonban előnyösen rekombináns  
DNS-technikák (lásd lentebb) alkalmazásával állítjuk elő. Különösen mutáns enzimeket állítunk  
elő ilyen módon, amelyek *P. maltophilaból* származó enzim olyan aminosav-szekvenciájával  
rendelkezik, amelyben a *P. maltophilaból* származó enzim szekvenciájához képest egy vagy  
több aminosav hozzáadása, delécioja vagy szubsztitúciója történt, például oligonukleotid-  
irányított mutagenézis, linkerpasztázó mutagenézis, polimeráz láncreakciót alkalmazó  
mutagenézis és hasonló alkalmazásával. Lásd Ausubel és munkatársai (szerk.), „Current  
20 Protocols In Molecular Biology” (Wiley Interscience, 1990), és McPherson (szerk.), „Directed  
Mutagenesis. A Practical Approach” (IRL Press, 1991).

A találmány egy második előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát ké-  
pezik a találmány szerinti dicamba-lebontó enzimeket kódoló, izolált DNS-molekulák. A le-  
írásban az „izolált” kifejezés azt jelenti, hogy a DNS-molekulát eltávolítottuk természetes kör-  
nyezetéből, vagy nem természetesen előforduló DNS-molekula. Ilyen DNS-molekulák előállí-  
tására szolgáló módszerek szakember számára ismertek. Lásd például Maniatis és munkatársai,  
„Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor, NY (1982); Sambrook és  
munkatársai, „Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor, NY (1989).

A találmány szerinti DNS-molekulák lehetnek például izolált cDNS-ek vagy genomi  
klónok, és lehetnek RNS-molekulák. *P. maltophilia* DI-6-törzsből származó, dicamba-lebontó  
enzimeket kódoló klónok azonosítását és izolálását a 2. és 4-5. példában írjuk le. Dicamba-  
lebontó enzimeket kódoló további klónokat hasonló módszerekkel lehet előállítani. Az izolált

klónokat vagy azok részeit próbaként lehet alkalmazni további klónok azonosítására és izolálására olyan organizmusokból, amelyek eltérnek azokról a organizmusoktól, amelyekből az eredetileg izolált klónok származtak. Alkalmas organizmusok lehetnek dicamba-lebontó baktériumok. A fentebb leírtak szerint, *P. maltophilia* DI-6-törzsön kívül számos baktériumtörzs ismeretes, amely képes dicambát lebontani. Lásd például 5,445,962. sz. USA-beli szabadalmi leírás; Krueger és mtsai., J. Agric. Food Chem. 37, 534-538 (1989); Cork és Krueger, Adv. Appl. Microbiol. 38, 1-66 (1991); Cork és Khalil, Adv. Appl. Microbiol. 40, 289-320 (1995).

A találmány szerinti DNS-molekulákat kémiai is lehet szintetizálni az izolált klónok szekvenciáinak felhasználásával. Ilyen technikák szakember számára ismertek. DNS-szekvenciákat például foszfoamidit-kémiai eljárással lehet szintetizálni automatizált DNS-szintetizátorban. A kémiai szintézisnek számos előnye van. A kémiai szintézis különösen azért kívánatos, mert a gazdaszervezet (amelyben a DNS-szekvenciát expresszáljuk) által előnyben részesített kódonokat lehet alkalmazni az expresszió optimalizálására. Nem szükséges minden kódot megváltoztatni ahhoz, hogy javított expressziót kapjunk, de előnyösen legalább a gazdaszervezetben ritkán használt kódonokat megváltoztatjuk a gazdaszervezet által előnyben részesített kódonokra. Nagymértékű expresszióhoz juthatunk, ha a kódonok legalább körülbelül 50%-át, legelőnyösebben legalább körülbelül 80%-át megváltoztatjuk a gazdaszervezet által előnyben részesített kódonokra. Sok gazdaszervezet kódonpreferenciája ismert. Lásd például „Maximizing Gene Expression”, 225-85. old. (Reznikoff & Gold, szerk., 1986), PCT WO 97/31115. sz. és PCT WO 97/11086. sz. nemzetközi közzétételi iratok, EP 646643., EP 553494. sz. európai közzétételi iratok és 5,689,052., 5,567,862., 5,567,600., 5,552,299. és 5,017,692. sz. USA-beli szabadalmi leírások. Más gazdasejtek kódonpreferenciáját szakember által ismert módszerekkel lehet levezetni. Kémiai szintézis alkalmazásával a DNS-molekula vagy az általa kódolt fehérje szekvenciáját is könnyen meg lehet változtatni, például az expresszió optimalizálása céljából (például mRNS szekunder struktúra eliminálása céljából, amely hatással van a transzkripcióra vagy transzlációra), egyedi restrikciós helyek kedvező helyekre való bevitele céljából, proteáz-hasítóhelyek deletálása céljából stb.

A találmány egy harmadik előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát képezik dicamba-lebontó enzimet kódoló DNS-t expressziós szabályzó szekvenciákhoz kapcsolva tartalmazó, vagy több olyan kódoló DNS-szekvenciát tartalmazó DNS-konstrukció, amelyek dicamba-lebontó enzimet kódolnak, és az egyes DNS-szekvenciák működőképesen vannak kapcsolva expressziós szabályzó szekvenciákhoz. A leírásban a „DNS-konstrukciók” olyan mesterségesen előállított (nem természetesen előforduló) DNS-molekulákat jelentenek,

amelyek DNS gazdasejtekbe való bevitelére alkalmasak, és a kifejezésen értünk kimérágénakat, expressziós kazettákat és vektorokat.

A leírásban „működőképesen kapcsolt” kifejezés DNS-szekvenciák kapcsolatára utal (például a szekvenciák sorrendjére, a szekvenciák orientációjára és a különböző szekvenciák közötti viszonylagos távolságra) oly módon, hogy a kódolt fehérjék expresszálnak. Expressziós szabályzó szekvenciák és kódoló szekvenciák működőképes összekapcsolására szolgáló eljárások szakember számára jól ismertek. Lásd például Maniatis és munkatársai, „Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor, NY (1982); Sambrook és munkatársai, „Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor, NY (1989).

„Expressziós szabályzó szekvenciák” olyan DNS-szekvenciák, amelyek bármilyen módon részt vesznek prokarióták és eukarióták transzkripciójának vagy translációjának szabályzásában. Alkalmas expressziós szabályzó szekvenciák, valamint előállításukra és alkalmazásukra szolgáló eljárások szakember által jól ismertek.

Az expressziós szabályzó szekvenciák mindenképpen tartalmaznak promotert. A promóter lehet bármilyen DNS-szekvencia, amely transzkripciós aktivitást mutat a kiválasztott gazdasejtben vagy gazdaszervezetben. A promóter lehet indukálható vagy konstitutív. Lehet természetesen előforduló, állhat különböző természetesen előforduló promóterek részeiből, vagy lehet részlegesen vagy teljesen szintetikus. Promóterek tervezéséhez nyújt segítséget a promóterszerkezet vizsgálata, például Harley és Reynolds által, *Nucleic Acids Res.* 15, 2343-61 (1987). A promóter transzkripciós start-helyhez való viszonylagos helyzetét is lehet optimalizálni [lásd például Roberts és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 760-4 (1979)]. Szakember számára prokariótákban és eukariótákban alkalmazható sok promóter ismeretes.

Növényekben alkalmazható konstitutív promóterek lehetnek például: növényi vírusokból származó promóterek, például karfiolmozaik-vírusból származó 35S-promóter [Odell és mtsai., *Nature* 313, 810-812 (1985)], földi mogyoróban előforduló klorózis csíkokat okozó caulimovírusból származó, teljes hosszúságú transzkriptum-promóter dupla enhanszerdoménnel [Maiti és Shepherd, *BBRC* 244, 440-444 (1998)], *Chlorella*-vírusból származó metiltranszferáz-gének promóterei (5,563,328. sz. USA-beli szabadalmi leírás) és *Scrofularia*-mozaikvírusból származó, teljes hosszúságú transzkripciós promóter (5,378,619. sz. USA-beli szabadalmi leírás); olyan génekből származó promóterek, mint rizsből származó aktin [McElroy és mtsai., *Plant Cell* 2, 163-171 (1990)], ubikitin [Christensen és mtsai., *Plant Mol. Biol.* 12, 619-632 (1989) és Christensen és mtsai., *Plant Mol. Biol.* 18, 675-689 (1992)], pEMU [Last és mtsai., *Theor. Appl. Genet.* 81, 581-588 (1991)], MAS [Velten és mtsai.,

EMBO J. 3, 2723-2730 (1984)], kukoricából származó H3-hisztón [Lepetit és mtsai., Mol. Gen. Genet. 231, 276-285 (1992) és Atanassova és mtsai., Plant Journal 2 (3), 291-300 (1992)], *Brassica napus*-ból származó ALS3 (WO 97/41228. sz. nemzetközi közzétételi irat); és különböző *Agrobacterium*-généből származó promóterek (lásd 4,771,002., 5,102,796., 5,182,200. és 5,428,147. sz. USA-beli szabadalmi leírások).

Növényekben alkalmazható indukálható promóterek lehetnek: az ACE1-rendszerből származó promóter, amely rézre ad választ [Mett és mtsai., PNAS 90, 4567-4571 (1993)]; kukoricából származó In2-gén promótere, amely benzol-szulfonamid-herbicide, safeners-re ad választ [Hershey és mtsai., Mol. Gen. Genetics 227, 229-237 (1991) és Gatz és mtsai., Mol. Gen. Genetics 243, 32-38 (1994)] és Tn10-ből származó Tet-represszor promótere [Gatz és mtsai., Mol. Gen. Genet. 227, 229-237 (1991)]. Különösen előnyös indukálható promóter növényekben való alkalmazásra az a promóter, amely olyan indukáló ágensre ad választ, amelyre növények normálisan nem adnak választ. Ilyen típusú indukálható promóter például szteroid-hormon génjéből származó indukálható promóter, amelynek transzkripció aktivitása glükokortikoszteroid hormonnal indukálható [Schena és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 10421 (1991)]. Más, növényekben alkalmazható, indukálható promóterek leírását lásd EP 332104. számú európai közzétételi iratban, PCT WO 93/21334. és PCT WO 97/06269. számú nemzetközi közzétételi iratokban.

Baktériumokban alkalmazható promóterek például *Bacillus stearothermophilus*-ból származó maltogén amiláz-gén promótere, *Bacillus licheniformis*-ből származó alfa-amiláz-gén promótere, *Bacillus amyloliquefaciens*-ből származó BAN amiláz-gén promótere, *Bacillus subtilis*-ből származó alkalikus proteáz-gén promótere, *Bacillus pumilus*-ból származó xylozidáz-gén promótere, lambda-fág P<sub>R</sub> és P<sub>L</sub> promóterei és *Escherichia coli*-ból származó lac-, trp- és tac-promóterek. Lásd PCT WO 96/23898. és PCT WO 97/42320. számú nemzetközi közzétételi iratokat.

Élesztő-gazdasejtekben alkalmazható promóterek például élesztőeredetű glikolitikus gének promóterei, alkohol dehidrogenáz gének promóterei, TPI1-promóter és ADH2-4c-promóter. Lásd PCT WO 96/23898. számú nemzetközi közzétételi iratot.

Fonális gombákban alkalmazható promóterek például ADH3-promóter, tpIA-promóter, *Aspergillus oryzae*-ból származó TAKA amilázt kódoló gének promóterei, *Rhizomucor miehe*-ből származó aszpartát-proteáz promótere, *Aspergillus niger*-ből származó neutrális alfa-amiláz promótere, *A. niger*-ből származó stabil alfa-amiláz promótere, *A. niger*-ből vagy *Aspergillus awamori*-ból származó glükóamiláz promótere, *R. miehe*-ből származó lipáz

promótere, *A. oryzae*ből származó alkalikus proteáz promótere, *A. oryzae*ből származó triózfoszfát izomeráz promótere és *Aspergillus nidulans*ből származó acetamidáz promótere. Lásd PCT WO 96/23898. számú nemzetközi közzétételi iratot.

5 Emlős sejtekben alkalmazható promóterek például az SV40-promóter, metallotionein-gén promótere, rágsálóból származó emlőtumor-vírusból származó promóter, Rous-szarkóma vírusból származó promóter és adenovírus-2-ből származó, fő, késői promóter. Lásd PCT WO 96/23898. és PCT WO 97/42320. számú nemzetközi közzétételi iratokat.

10 Rovarsejtekben alkalmazható promóterek például polihedrin-promóter, P10-promóter, *Autographa californica*ból származó polihedrózis-vírus bázikus fehérje promótere, baculovírusból származó, azonnali korai gén-1 promótere és baculovírusból származó, 39K-jelű késleltetett korai gén promótere. Lásd PCT WO 96/23898. számú nemzetközi közzétételi iratot.

15 Végül, más promóterek részeiből felépített promótereket, és részlegesen vagy teljesen szintetikus promótereket is lehet alkalmazni [lásd például Ni és mtsai., Plant J. 7, 661-676 (1995) és PCT WO 95/14098. számú nemzetközi közzétételi iratot, amelyekben ilyen, növényekben alkalmazható promótereket írnak le].

A promóter tartalmazhat egy vagy több enhanszer elemet, vagy úgy lehet módosítva, hogy egy vagy több enhanszer elemet tartalmaz. A promóter előnyösen több enhanszer elemet tartalmaz. Enhanszer elemeket tartalmazó promóterek nagyobb mértékű transzkripciót biztosítanak olyan promóterekhez képest, amelyek nem tartalmazzák azokat. Növényekben alkalmazható enhanszer elemek például karfiolmozaik-vírusból származó 35S-enhanszer elem (5,106,739. és 5,164,316. számú USA-beli szabadalmi leírások) és *Scrofularia*-mozaikvírusból származó enhanszer elem [Maiti és mtsai., Transgenic Res. 6, 143-156 (1997)]. Más sejtekben alkalmazható enhanszer elemek is ismeretesek. Lásd PCT WO 96/23898. számú nemzetközi közzétételi iratot, és "Enhancers And Eukaryotic Expression" (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1983).

30 Hatékony expresszió céljából a kódoló szekvenciát előnyösen 3'-végi nem-transzlálódó szekvenciához is kapcsoljuk működőképesen. A 3'-végi nem-transzlálódó szekvencia transzkripciós és/vagy transzlációs terminációs szekvenciákat tartalmaz. 3'-végi nem-transzlálódó régiókhoz bakteriális, növényi vagy más eukarióta sejtek génjeinek szegélyező régióiból juthatunk. Prokariótákban való alkalmazásra a 3'-végi nem-transzlálódó régió transzkripciós terminációs szekvenciát tartalmaz. Növényekben és más eukariótákban való alkalmazásra a 3'-végi nem-transzlálódó régió transzkripciós terminációs szekvenciát és poliadenilálási

szekvenciát tartalmaz. Növényekben alkalmazható 3'-végi nem-transzlálódó szekvenciák például karfiolmozaik-vírusból származó 35S-génből, fazeolin (magi tartaléktápanyag-fehérje) génjéből, borsóból származó, ribulóz-bifoszfát karboxiláz kis alegységének E9-génjéből, szójababból származó, 7S tartaléktápanyag-fehérje géneiből, oktopin-szintetáz-génből és nopalinszintetáz-génből származó szekvenciák.

Növényekben és más eukariótákban 5'-végi nem-transzlálódó szekvenciákat is alkalmazunk. Az 5'-végi nem-transzlálódó szekvencia az a mRNS-rész, amely az 5'-végi CAP-helytől a transzlációs iniciációs kódonig terjed. Ez a mRNS-régió a transzlációs iniciációhoz szükséges eukariótákban, és szerepet játszik a génexpresszió szabályzásában. Növényekben alkalmazható 5'-végi nem-transzlálódó régiók például lucerna-mozaikvírusból, uborkamozaikvírusból származó burokfehérje génjéből és dohánymozaik-vírusból származnak.

A fentebb említettek szerint, a DNS-konstrukció lehet vektor. A vektor tartalmazhat egy vagy több olyan replikációs rendszert, amely lehetővé teszi annak replikációját gazdasejtekben. Önreplikációra képes vektorok lehetnek plazmidok, kozmidok és vírusvektorok. Más esetben a vektor lehet integrálódó vektor, amely lehetővé teszi, hogy a találmány szerinti dicamba-lebontó enzimet kódoló szekvencia integrálódjon a gazdasejt kromoszómájába. Kíváncos, hogy a vektor egyedi restrikciós helyekkel rendelkezze a DNS-szekvencia inszertálása céljából. Ha a vektor nem rendelkezik egyedi restrikciós helyekkel, módosítani lehet azt restrikciós helyek bevitele vagy eliminálása céljából, amely még alkalmasabbá teszi azt a további manipulációkhoz.

A találmány szerinti DNS-konstrukciókat különböző gazdasejtek transzformálására lehet alkalmazni (lásd lentebb). Genetikai markert ("szelektálható markert") kell alkalmazni a transzformált gazdasejtek szelektálása céljából. A szelektálható markerek tipikusan lehetővé teszik a transzformált sejtek kinyerését negatív szelekcióval (azaz olyan sejtek növekedésének gátlásával, amelyek nem tartalmaznak szelektálható markert) vagy a szelektálható marker által kódolt termékre való szkriningeléssel.

A legelterjedtebben alkalmazott szelektálható markergén növénytranszformáció esetén Tn5-ből izolált, neomicin foszfortranszferáz-II (nptII) génje, amelyet ha növényi szabályzó szignálok vezérelnék, kanamicin-rezisztenciát határoz meg [Fraley és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4803 (1983)]. Egy másik elterjedten alkalmazott szelektálható markergén a higromicin foszfortranszferáz génje, amely higromicin-antibiotikumra határoz meg rezisztenciát [Vanden-Elzen és mtsai., Plant Mol. Biol. 5, 299 (1985)].

További, antibiotikum-rezisztenciát meghatározó, bakteriális eredetű szelektálható

markergének például gentamicin acetiltranszferáz, sztreptomycin foszfozotranszferáz, aminoglikozid 3'-adeniltranszferáz és bleomicin rezisztencia-determináns [Hayford és mtsai., *Plant Physiol.* **86**, 1216 (1988); Jones és mtsai., *Mol. Gen. Genet.* **210**, 86 (1987); Svab és mtsai., *Plant Mol. Biol.* **14**, 197 (1990); Hille és mtsai., *Plant Mol. Biol.* **7**, 171 (1986)]. Más, szelektálható markergének herbicidrezisztenciát határoznak meg, például glifozát, glüfozinát vagy bromoxynil ellen [Comai és mtsai., *Nature* **317**, 741-744 (1985); Gordon-Kamm és mtsai., *Plant Cell* **2**, 603-618 (1990) és Stalker és mtsai., *Science* **242**, 419-423 (1988)].

Növénytranszformációra szolgáló, nem bakteriális eredetű, más szelektálható markergének is ismeretesek. Ilyen gének például egérből származó dihidrofolát reduktáz, növényi 5-enol-piruvil-sikimát-3-foszfát szintetáz és növényi acetolaktát szintetáz [Eichholtz és mtsai., *Somatic Cell Mol. Genet.* **13**, 67 (1987); Shah és mtsai., *Science* **233**, 478 (1986); Charest és mtsai., *Plant Cell Rep.* **8**, 643 (1990)].

Feltételezhetően transzformált sejtek szkrinelésére általánosan alkalmazott gének például  $\beta$ -glükuronidáz (GUS),  $\beta$ -galaktozidáz, luciferáz és klóramfenikol acetiltranszferáz génje [Jefferson, R. A., *Plant Mol. Biol. Rep.* **5**, 387 (1987); Teeri és mtsai., *EMBO J.* **8**, 343 (1989); Koncz és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 131 (1987), De Block és mtsai., *EMBO J.* **3**, 1681 (1984)], zöld fluoreszcens fehérje (GFP) génje [Chalfie és mtsai., *Science* **263**, 802 (1994); Haselhoff és mtsai., *TIG* **11**, 328-329 (1995) és PCT WO 97/41228. számú nemzetközi közzétételi irat]. Viszonylag ritka transzformációs események azonosítására szolgáló másik megközelítésben olyan gént alkalmazunk, amely *Zea mays*-ban antocianin-pigmentációs folyamatsor domináns konstitutív szabályozóját tartalmazza [Ludwig és mtsai., *Science* **247**, 449 (1990)].

Prokariótákban és eukariótákban alkalmazható, növényekben alkalmazottaktól eltérő, alkalmas szelektálható markerek szintén jól ismertek. Lásd például PCT WO 96/23898. és PCT WO 97/42320. sz. nemzetközi közzétételi iratokat. Például antibiotikum-rezisztenciát (ampicillinre, kanamicinre, tetraciklinre, klóramfenikolra, neomicinre vagy higromicinre) alkalmazhatunk szelektálható markerként.

A találmány szerinti megoldás másik vonatkozása szerint dicamba-toleranciát alkalmazhatunk szelektálható markerként növényekre vagy növényi sejtekre. A „tolerancia” azt jelenti, hogy transzformált növényi sejtek képesek növekedni, ha akkora mennyiségű dicambát tartalmazó tenyésztő táptalajra helyezünk azokat, amely megakadályozza nem-transzformált sejtek növekedését. A „tolerancia” azt is jelenti, hogy transzformált növények képesek növekedni azt követően is, hogy akkora mennyiségű dicambával kezeljük azokat, amely nem-

transzformált növények növekedését gátolja.

Transzformált növényi sejtek szelekciójára szolgáló eljárások szakember számára jól ismertek. Röviden összefoglalva, növényi sejtek populációjában (például egy explantátumban vagy embrionális szuszpenziós tenyészetben) legalább néhány növényi sejtet transzformálunk dicamba lebontását lehetővé tevő DNS-konstrukcióval vagy DNS-konstrukciók kombinációjával. Az eredményül kapott növényi sejtpopulációt olyan tenyésztő táptalajra helyezzük, amelyben úgy választjuk meg a dicamba koncentrációját, hogy a transzformált növényi sejtek növekedjenek, míg a nem-transzformált növényi sejtek ne növekedjenek. A megfelelő dicamba-koncentrációkat empirikusan határozzuk meg szakember által ismert módon.

Transzformált növények szelekciójára szolgáló módszerek szakember számára jól ismertek. Röviden összefoglalva, dicambával kezelünk egy olyan növénypopulációt, amelyről feltételezzük, hogy a dicamba lebontását lehetővé tevő, DNS-konstrukciót vagy DNS-konstrukciók kombinációját tartalmazza. A dicamba mennyiségét úgy választjuk meg, hogy a transzformált növényi sejtek növekedjenek, és a nem-transzformált növényi sejtek növekedése gátolva legyen. Az inhibíció mértéke elegendő kell, hogy legyen arra, hogy a transzformált és a nem-transzformált növények könnyen megkülönböztethetők legyenek egymástól (azaz az inhibíciónak statisztikusan szignifikánsnak kell lennie). Ilyen mennyiségeket empirikusan lehet meghatározni szakember által ismert módon.

Továbbá, 3,6-DCSA képződését, mint a dicamba lebontásának eredményét lehet felhasználni szelekcióra és szkrínelésre. 3,6-DCSA képződése könnyen meghatározható ezen vegyület fluoreszcenciájának megfigyelésével, amely transzformált gazdasejtek, intakt organizmusok és organizmus-részek (például mikroorganizmusok, növények, növényi részek és növényi sejtek) szelekcióját és szkrínelését teszi lehetővé. Ebben a vonatkozásban a találmány szerinti megoldás lehetővé teszi transzformált gazdasejtek, intakt organizmusok és organizmus-részek szelekcióját és szkrínelését ugyanúgy, mint a zöld fluoreszcens fehérje esetén (lásd 5,162,227. és 5,491,084. számú USA-beli szabadalmi leírásokat és PCT WO 96/27675., WO 97/11094., WO 97/41228. és WO 97/42320. számú nemzetközi közzétételi iratokat, melyeket a kitanítás részének tekintünk). Főleg a szokásos spektrometriás módszerekkel lehet 3,6-DCSA-t detektálni transzformált gazdasejtekben, intakt organizmusokban és organizmus-részekben. Például mikroszkópra szűrőkombinációt lehet csatlakoztatni fluoreszcencia gerjesztéséhez és detektálásához. Kézilámpát lehet alkalmazni laboratóriumi vagy terepen végzett munkához (lásd 1. példát). Fluoreszcens aktiválásra alapuló sejtosztályozást is lehet alkalmazni. 3,6-DCSA gerjesztési hullámhossza 312-313 nm, a maximális emisszió hullámhossza 424

nm.

Organizmusok „részei”: szervek, szövetek vagy bármilyen más rész. „Növényi részek” lehetnek magok, pollen, embriók, virágok, gyümölcsök, sarjak, levelek, gyökerek, szárak, explantátumok stb.

- 5 Dicamba-toleranciára vagy dicamba-lebontásra alapuló szelekciót alkalmazhatunk dicamba-toleráns növények vagy dicamba-lebontó mikroorganizmusok előállításában, amely esetekben más szelektálható marker alkalmazására nincs szükség. Dicamba-toleranciára vagy dicamba-lebontásra alapuló szelekciót alkalmazhatunk olyan transzgenikus sejtek vagy orga-
- 10 nizmusok előállítása során, amelyek más kérdéses géneket expresszálnak. Sok ilyen gén ismeretes, amelyek kereskedelmi értékkel rendelkező fehérjéket kódolnak, valamint növényeken javított mezőgazdasági tulajdonságokat meghatározó gének (lásd például PCT WO 97/41228. számú nemzetközi közzétételi iratot, melyet teljes egészében a kitanítás részének tekintünk).

- A találmány szerinti DNS-konstrukciókat különböző gazdasejtek, például prokarióták és eukarióták transzformálására lehet alkalmazni. Dicamba-lebontó enzime(ke)t és a szelektál-
- 15 ható markert kódoló DNS-szekvenciák (ha külön szelektálható markert alkalmazunk) lehetnek ugyanazon vagy különböző DNS-konstrukciókon. Előnyösen egyetlen DNS-konstrukción, transzkripciós egységként vannak elhelyezve úgy, hogy valamennyi kódoló szekvencia együtt expresszálódik. A kérdéses gén(ek) és a dicamba-lebontó enzime(ke)t kódoló DNS-szekvencia (DNS-szekvenciák) (ha szelektálható markerként dicamba-toleranciát vagy dicamba-lebontást
- 20 alkalmazunk) lehetnek ugyanazon vagy különböző DNS-konstrukcióban is. Ilyen DNS-konstrukciókat a fentebb leírtak szerint állítunk elő.

- Alkalmas gazdasejtek lehetnek prokarióta és eukarióta mikroorganizmusok (például baktériumok, például *Agrobacterium tumefaciens* és *Escherichia coli*t, élesztők, például *Saccharomyces cerevisiae* és más gombák, például *Aspergillus* fajok), növényi sejtek, rovar-
- 25 sejtek és emlős sejtek. A gazdasejt előnyösen olyan sejt, amely normálisan nem képes dicambát lebontani. A találmány szerinti megoldást alkalmazhatjuk olyan gazdasejtek dicamba-lebontási mértékének fokozására, amelyek normálisan képesek dicambát lebontani.

- Tehát a találmány szerinti „transzgenikus” sejtek és organizmusok közé olyan sejtek és organizmusok tartoznak, amelyek normálisan nem képesek dicambát lebontani, de amelyek
- 30 a találmány szerint transzformálva képesek lebontani ezt a herbicidet. A találmány szerinti „transzgenikus” sejtek és organizmusok közé tartoznak olyan sejtek és organizmusok is, amelyek normálisan képesek dicambát lebontani, de amelyek a találmány szerint transzformálva több ilyen herbicidet képesek lebontani vagy a herbicidet hatékonyabban képesek lebontani.

Prokarióta és eukarióta gazdasejtek transzformálására szolgáló eljárások szakember számára jól ismertek. Lásd például Maniatis és munkatársai, „Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor, NY (1982); Sambrook és munkatársai, „Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor, NY (1989).

5 Például számos eljárást fejlesztettek ki növények transzformációjára, beleértve biológiai és fizikai transzformációs eljárásokat. Lásd például Miki és munkatársai, „Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants”, „Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology” című könyvben, Glick, B. R. és Thompson, J. E. szerk. (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1993), 67-88. old. Továbbá rendelkezésre állnak növényi sejt vagy szövet  
10 transzformálására és növények regenerálására szolgáló vektorok és *in vitro* tenyésztési eljárások. Lásd például Gruber és munkatársai, „Vectors for Plant Transformation”, „Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology” című könyvben, Glick, B. R. és Thompson, J. E. szerk. (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1993), 89-119. old. A 6. példában leírunk egy konkrét példát növények transzformálására, a találmány szerinti megoldás alkalmazásával.

15 A legelterjedtebben alkalmazott eljárás expressziós vektor növényekbe való bevitelére *Agrobacterium*ot alkalmazó természetes transzformációra alapul [lásd például Horsch és mtsai., Science 227, 1229 (1985)]. *A. tumefaciens* és *A. rhizogenes* növényi patogén talajbaktériumok, amelyek genetikailag képesek növényi sejteket transzformálni. *A. tumefaciens*ből és *A. rhizogenes*ből származó Ti- és Ri-plazmidok, sorrendben, a növény genetikai transzformálá-  
20 sáért felelős géneket hordoznak [lásd például Kado, C. I., Crit. Rev. Plant Sci. 10, 1 (1991)]. *Agrobacterium*-vektorrendszerek és *Agrobacterium*-közvetített géntranszfert alkalmazó eljárásokat számos hivatkozásban leírnak, például Miki és munkatársai, mint fent; Moloney és munkatársai, Plant Cell Reports 8, 238 (1989); és 4,940,838. és 5,464,763. sz. USA-beli szabadalmi leírások.

25 Növénytranszformációra általánosan alkalmazható módszer mikrorészecske-közvetített transzformáció, amelyben DNS-t mikrorészecskék felszínén továbbítunk. Az expressziós vektort bioliztikus berendezéssel visszük be növényi szövetekbe, amely akkora sebességre gyorsítja fel a mikrorészecskéket, amely elegendő a növényi sejtfalakon és membránokon való átjutáshoz [Stanford és mtsai., Part. Sci. Technol. 5, 27 (1987); Sanford, J. C., Trends Biotech.  
30 6, 299 (1988); Sanford, J. C. Physiol. Plant 79, 206 (1990); Klein és mtsai., Biotechnology 10, 268 (1992)].

DNS növényekbe fizikai való célba juttatására szolgáló másik módszer célsejtek ultrahangos kezelése (szonikálása) [Zhang és mtsai., Bio/Technology 9, 996 (1996)]. Más módszer

szerint liposzóma- vagy szferoplaszt-fúziót alkalmazunk expressziós vektorok növényekbe való bevitelére [Deshayes és mtsai., *EMBO J.* **4**, 2731 (1985); Christou és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3962 (1987)]. Protoplasztok közvetlen DNS-felvételét is leírták  $\text{CaCl}_2$ -os kicsapás, polivinil-alkohol vagy poli-L-ornitin alkalmazásával [Hain és mtsai., *Mol. Gen. Genet.* **199**, 161 (1985) és Draper és mtsai., *Plant Cell Physiol.* **23**, 451 (1982)]. Protoplasztok és egész sejtek és szövetek elektroporációját is leírták [Donn és mtsai., "Abstracts of VIIIth International Congress on Plant Cell and Tissue Culture IAPTC", A2-38, 53. old. (1990); D'Halluin és mtsai., *Plant Cell* **4**, 1495-1505 (1992); Spencer és mtsai., *Plant Mol. Biol.* **24**, 51-61 (1994)].

A találmány szerinti megoldással bármilyen típusú transzgenikus, dicamba-toleráns növényt létre lehet hozni. Különösen széles lomblevelű növényeket (például babok, szójababok, gyapot, borsók, burgonyák, napraforgók, paradicsomok, dohány, gyümölcsfák és dísznövények és fák) lehet így transzformálni, amelyekről jelenleg ismeretes, hogy a dicamba károsítja azokat, így a herbicidre toleránssá válnak. Más növényeket (például kukorica, cirok, gabonafélék, cukornád, spárga és füvek) is lehet transzformálni, amelyeket jelenleg dicambára toleránsnak tekintünk, így megnöveljük a herbicid irányában mutatott toleranciájukat. Konkrétan, bármilyen kétszikű vagy egyszikű növényt lehet transzformálni a találmány szerinti DNS-konstrukciókkal. A „toleráns” kifejezés azt jelenti, hogy a transzformált növények akkora mennyiségű dicamba jelenlétében képesek növekedni, amely gátolja a nem-transzformált növények növekedését.

Előre látható, hogy a találmány szerinti, dicamba-lebontó oxigenázok a transzgenikus gazdasejtekben és organizmusokban található endogén reduktázokkal és ferredoxinokkal együtt képesek működni dicamba lebontásában. Növényi kloroplasztiszok különösen gazdagok reduktázokban és ferredoxinokban. Ennek megfelelően, a találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, transzgenikus, dicamba-toleráns növények előállítására olyan peptidet (például tranzitpeptidet) kódoló szekvenciát alkalmazunk, amely a dicamba-lebontó oxigenázt a kloroplasztiszba juttatja („kloroplasztiszba juttató szekvencia”). A kloroplasztiszba juttató szekvenciát kódoló DNS előnyösen a dicamba-lebontó oxigenázt kódoló szekvenciától szintézisiránnyal szemben (5'-irányban) helyezkedik el, de el lehet azt helyezni a kódoló szekvenciától szintézisirányban (3'-irányban) is, vagy a kódoló szekvenciától mind szintézisiránnyal szemben, mind szintézisirányban. Bármilyen alkalmas kloroplasztiszba juttató szekvenciát lehet alkalmazni. Kloroplasztiszba juttató szekvencia például kukoricából származó cab-m7-szignálszekvencia [lásd Becker és mtsai., *Plant Mol. Biol.* **20**, 49 (1992) és PCT WO

97/41228. számú nemzetközi közzétételi irat], borsóból származó glutation reduktáz szignál-szekvencia [Creissen és mtsai., Plant J. 2, 129 (1991) és PCT WO 97/41228. számú nemzetközi közzétételi irat] és borsóból származó ribulóz-1,5-bifoszfát karboxiláz kis alegységének szignálszekvenciája (19. azonosítószámú szekvencia [Fluhr és mtsai., EMBO J. 5, 2063-2071 (1986)]]. A találmány egy alternatív előnyös megvalósítási módja szerint közvetlenül transzformálunk kloroplasztiszokat olyan konstrukcióval, amelyek kloroplasztiszban működőképes promótert tartalmaz, így a kloroplasztiszban kapunk oxigenáz-expressziót [lásd például WO 95/24492. számú nemzetközi közzétételi iratot és 5,545,818. számú USA-beli szabadalmi leírást]. Természetesen, ha a kiválasztott transzgenikus gazdasejt vagy organizmus nem termel  
 5  
 10 elegendő endogén reduktázt, ferredoxint vagy mindkettőt, a gazdasejtet vagy organizmust transzformálni lehet úgy, hogy az egyik vagy mindkét enzimet, valamint oxigenázt termeljen.

A találmány másik előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgya eljárás gyomnövények kiirtására olyan szántóföldön, ahol transzgenikus, dicamba-toleráns növények növekednek. Az eljárásban hatásos mennyiségű dicambát juttatunk a szántóföldre a gyomok  
 15 kiirtása céljából. Dicamba alkalmazására szolgáló módszerek és különböző típusú gyomok kiirtására hatásos mennyiségű dicamba mennyiségei ismeretesek [lásd "Crop Protection Reference", 1803-1821. old., Chemical & Pharmaceutical Press, Inc. New York, NY, 11. kiadás (1995)].

A találmány másik előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgya eljárás egy  
 20 anyagban, például talajban, vízben vagy dicamba-gyártó üzemben keletkezett hulladékban lévő dicamba lebontására. Ilyen lebontást a találmány szerinti dicamba-lebontó enzimekkel lehet végezni. Az enzimeket olyan mikroorganizmusokból tisztítjuk, amelyek természetes módon expresszálják azokat (lásd az 1. vagy 3. példát) vagy azokat termelő transzgenikus gazdasejtekből lehet tisztítani. Ha ilyen enzimeket alkalmazunk az eljárásokban, akkor a megfelelő  
 25 kofaktorokat is biztosítani kell (lásd 1. példát). A hatásos mennyiségeket szakember által ismert módon, empirikusan lehet meghatározni (lásd 1. példát). Más módszer szerint, transzgenikus prokarióta és eukarióta mikroorganizmusokat lehet alkalmazni dicamba lebontására ilyen anyagokban. Transzgenikus prokarióta és eukarióta mikroorganizmusokat a fentebb leírtak szerint lehet előállítani, és a hatásos mennyiségeket szakember által ismert módon, empirikusan  
 30 lehet meghatározni.

Dicamba nagy mennyiségekben, folyamatosan jut a környezetbe. A dicamba eliminálása nagyrészt a föld talajában és vizeiben élő mikroorganizmusokban található enzimrendszer hatásától függ. Az, hogy megértsük az említett enzimrendszerek, például dicamba-lebontó O-

demetilázok és három komponensének működését, fontos a természetes és genetikailag módosított mikroorganizmusok kiaknázásáért tett erőfeszítésekhez, amelyeket bioremediációra és szennyezett talaj, víz és más anyagok helyreállítására alkalmazunk. Tehát a találmány szerinti dicamba-lebontó enzimeket, DNS-molekulákat, DNS-konstrukciókat stb. kutatási eszközként alkalmazhatjuk a dicamba-lebontás és bioremediációs kutatásában.

Végül, a találmány szerinti dicamba-lebontó enzimeket dicamba meghatározására szolgáló vizsgálati eljárásokban alkalmazunk. A vélhetően dicambát tartalmazó mintát összekeverjük dicamba-lebontó O-demetilázal vagy dicamba-lebontó oxigenáz, dicamba-lebontó ferredoxin és dicamba-lebontó reduktáz kombinációjával. Megfelelő vizsgálati eljárásokat az 1. és 3. példában írunk le. Főleg a 3,6-DCSA képződésére visszavezethető fluoreszcencia detektálása vagy mérése tesz lehetővé könnyen elvégezhető vizsgálati eljárást.

### 1. példa

#### *Pseudomonas maltophilia* DI-6-törzsből származó dicamba O-demetiláz komponenseinek tisztítása és jellemzése

#### 15 **ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK:**

**Baktérium és növesztési körülmények.** *Pseudomonas maltophilia* DI-6-törzset dicambával tartósan szennyezett talajból izoláltunk [Kreuger és mtsai., J. Agric. Food Chem., 37, 534-538 (1989)]. A baktériumot Dr. Douglas Cork bocsátotta rendelkezésünkre (Illinois Institute of Technology, Chicago, IL), és redukált klorid-tápközegben tartottuk fent [Kruger, J. P., Ph.D. thesis, Illinois Institute of Technology, Chicago, IL (1989)], melyet dicambával (2 mg/ml), vagy glükózzal (2 mg/ml) és „Casamino”-savakkal (2 mg/ml) egészítettünk ki. A szénforrásokat szűrővel sterilizáltuk és a tápközeghez autoklávozás után adtuk hozzá. Szilárd táptalajt 1 vegyes-% Gelrite (Scott Laboratories, West Warwick, R.I.) hozzáadásával állítottunk elő.

**Vegyszerek és reagensek.** Dicambát, 3,6-DCSA-t és [ $^{14}\text{C}$ ]-dicambát (U-fenil- $^{14}\text{C}$ , 42,4 mCi/mmol, radiokémiai tisztasága 98%-nál nagyobb) a Sandoz Agro, Inc. cégtől (Des Plaines, IL) szereztük be. Az oldhatóság fokozása céljából a dicamba- és a 3,6-DCSA-törzssoldatokat KOH-val titráltuk pH 7,0-re. Valamennyi vegyszert a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) cégtől szereztünk be, hacsak másképpen nem jelöljük. Superose 12, Mono Q, Q-Sepharose (Fast Flow) és Phenyl-Sepharose (CL-4B) oszlopokat illetve tölteteket az FPLC-készülékhez (nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfhoz) a Pharmacia cégtől (Milwaukee, WI) cégtől szereztük be. Ampholyte pH 4-6-ot és ampholyte pH 4-9-et a Serva (Heidelberg, Németország) cégtől szereztük be. Akrilamidot,  $\beta$ -merkaptotetanolt, N,N,N',N'-tetrametil-

etiléndiamint (TEMED) és ammónium-perszulfátot (APS) a Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA) cégtől szereztük be. Vékonyréteg-kromatográfiás lemezeken (TLC) szilikagél volt (250  $\mu$ m vastagságú) UV 254 indikátorral, ezeket J. T. Barker Chemical Co. cégtől (Phillipsburg, NJ) szereztük be.

5            **Enzimaktivitást vizsgáló eljárások.** Dicamba O-demetiláz-aktivitást [ $^{14}$ C]-3,6-DCSA kialakulásával mértünk [ $^{14}$ C]-dicambából. Röviden összefoglalva, az enzim-komponensek keverékeiben az aktivitást 30°C-on mértük, egy standard 300  $\mu$ l-es reakciókeverék 25 mM kálium-foszfát-puffert (pH 7,0), 10 mM  $MgCl_2$ -ot, 0,5 mM NADH-t (béta-nikotinamid-adenin-dinukleotid, redukált forma), 0,5 mM vas(II)-szulfátot, 50  $\mu$ M hideg dicambát, 2,5  $\mu$ M [ $^{14}$ C]-dicambát (a radioaktív dicamba végső specifikus aktivitása 1,9 mCi/mmol volt), és különböző mennyiségű sejtlyázatot vagy részlegesen tisztított enzimet tartalmazott. Az utolsó tisztítási lépésekben valamennyi enzimaktivitást vizsgáló eljárást foszfát-pufferben végeztünk, mivel azt találtuk, hogy a dicamba O-demetiláz aktivitás pH-optimuma a foszfát-pufferek középső tartományában volt, és foszfát-pufferben magasabb enzimaktivitást figyeltünk meg, mint Tris-HCl-pufferben [tris-(hidroxi-metil)-aminometán-hidroklorid] pH 7,0-en. A reakciókat a szubsztrát, a dicamba hozzáadásával indítottuk. Meghatározott időpontokban a reakciókat 50  $\mu$ l 5 tf%-os kénsav hozzáadásával állítottuk le. A dicambát és dicamba-metabolitokat azután kétszer extraháltuk egy térfogat éterrel, és az extraktumokat szárazra pároltuk. Az extrakciós eljárás kitermelése (átlag  $\pm$  standard deviáció) 87%  $\pm$  2% volt dicambára és 85%  $\pm$  3% 3,6-DCSA-ra [Yang és mtsai., Anal. Biochem. 219, 37-42 (1994)].

15            [ $^{14}$ C]-dicambát és [ $^{14}$ C]-jelölt metabolitokat vékonyréteg-kromatográfiával (TLC) választottuk el. Az éterrel extrahált dicambát és metabolitjait 50  $\mu$ l éterben vettük fel a TLC-lapra való felvitel előtt. A TLC-hez használt oldószer-rendszer kloroform-etanol-ecetsav (85:10:5 térfogatarányban) volt. Az elválasztott reakciótermékeket úgy tettük láthatóvá és mérhetővé, hogy a TLC-lemezeket foszfór-ernyőre helyeztük 24 óra hosszáig, és azután PhosphorImager SF (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) készülékben szkríneltük azokat. A TLC-lapokon lévő foltok radioaktivitásának mennyiségét úgy határoztuk meg, hogy egy adott foltból származó összes pixel számát viszonyítottuk ugyanezen a lemezen lévő, ismert mennyiségű [ $^{14}$ C]-dicamba foltjának pixelszámához. Egy egység aktivitást akkora enzim mennyiségként definiálunk, amely 1 nmol 3,6-DCSA-t állít elő percenként 30°C-on. A specifikus aktivitásokat a vizsgálati eljárásban alkalmazott reakciókeverékekben lévő össz-fehérjekoncentrációra vonatkoztattuk.

A dicamba demetiláz reduktáz komponensének aktivitását 2,6-diklór-fenol-indofenol (DCIP) redukciójának mérésével határoztuk meg Hitachi U-2000 spektrofotométerben. A reakció 0,5 mM NADH-t, 0,2 mM FAD-ot (flavin-adenin-dinukleotid), 50  $\mu$ M DCIP-et, 20 mM Tris-puffert (pH 8,0) és 100-100  $\mu$ l enzimmintát tartalmazott 1 ml össztérfogatban. Az abszorbancia változását 600 nm-en szobahőmérsékleten mértük. A specifikus aktivitást a redukált DCIP 600 nm-en mért, 21,0 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> extinkciós koefficienséből számítottuk ki. A specifikus aktivitást nmol percenként redukált DCIP-ként fejeztük ki 1 mg fehérjére vonatkoztatva.

Továbbá *in situ* DCIP-vizsgálati eljárást alkalmaztunk a reduktáz-aktivitás detektálására és lokalizálására az izoelektromos fókuszáló (IEF) géleken elválasztott fehérjepreparátumokban. Miután a fehérjéket IEF-gélen elektroforetizáltuk, a sávokat kivágtuk a gélből, és 20 ml, hideg, 20 mM Tris-HCl-pufferrel (pH 8,0) mostuk. Alacsony olvadáspontú agarózt feloldottunk 10 ml, 20 mM Tris-HCl-pufferben (pH 8,0) való melegítéssel, 1,5 vegyes-% végkoncentrációban. Amikor az agaróz lehűlt szobahőmérséklet közelébe, kiegészítettük 0,2 mM FAD-al, 50  $\mu$ M DCIP-vel és 0,5 mM NADH-val. A vizsgálati eljárás reakciókeverékét üveglemezre öntöttük és hagytuk megszilárdulni. A gél a megszilárdult reakciókeverék tetejére helyeztük, és 15 percre hagytuk, hogy felvegye a szobahőmérsékletet. Ha a gélselet reduktáz-aktivitással rendelkező fehérjét tartalmazott, a redukált DCIP szintelen sávja alakult ki a DCIP kék hátterében.

**Sejtlizátumok.** A sejteket addig növesztettük rázógépen (250 rpm, 30°C-on), amíg 550 nm-en mért optikai denzitásuk 1,3-1,5 lett folyadékban, csökkentett kloridot tartalmazó, glükóz és „Casamino”-savak keverékét tartalmazó tápközegben. A sejteket centrifugálással elkülönítettük, kétszer mostuk hideg 100 mM MgCl<sub>2</sub>-ban, és újra centrifugáltuk. A sejtpasztát vagy rögtön felhasználtuk, vagy gyorsan lefagyasztottuk folyékony nitrogénben, és -80°C-on tároltuk. Az enzim tisztításakor 25 g fagyasztott sejtet felolvasztottunk, és 50 ml izoláló pufferben felfuszpendáltuk, amely 25 mM Tris-puffert (pH 7,0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>-ot és 0,5 mM EDTA-t tartalmazott. Fenil-metil-szulfonil-fluoridot és ditiotreitol adtunk hozzá, 0,5 mM és 1 mM végkoncentrációban, sorrendben. 10 mg lizozim és 1 mg Dnáz hozzáadása után a sejteket 10 percig kevertettük jégen és szonikálással (szonikátor: XL2020-modell; Heat Systems) összetörtük azokat jégen, a szonikátort közepes teljesítményre állítottuk („setting 5”), a szonikálás 20 másodpercig tartott és 40 másodperc szünet volt. Az így kapott sejtlizátumot 90 ml-re hígítottuk izoláló pufferrel, és centrifugáltuk 76.000 x g-n, 1 óra hosszáig, 4°C-on. A felülúszót használtuk tiszta sejtlizátum-forrásként.

**Enzimtisztítás.** Valamennyi eljárást 4°C-on végeztük, hacsak másképpen nem jelöljük.

Szilárd ammónium-szulfátot lassan adagoltunk 90 ml térfogatú, tiszta sejtlizátumba 40 vegyes-% telítettségig, állandó kevertetés közben. 15 perc kevertetés után a keveréket 15.400 x g-n centrifugáltuk 15 percig, és a csapadékot kidobtuk. További szilárd ammónium-szulfátot adagoltunk 70 vegyes-% telítettségig, a felülúszó állandó kevertetése közben. 15 perc kevertetés után a keveréket a fentebb leírt körülmények között centrifugáltuk. A felülúszót kidobtuk, és a csapadékot minimális térfogatú A-pufferben (20 mM TRIS pH 8,0, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM EDTA, 5 térfogat-% glicerín és 1 mM ditiotritol) feloldottuk.

A 40%-70% ammónium-szulfát-telítettségű kicsapódott anyagot azután FPLC-készülékbe kötött Phenyl-Sepharose-oszlopra (2,5 x 10 cm) vittük, és csökkenő ammónium-szulfát-gradienssel (10 vegyes-%-ról 0 vegyes%-ra) eluáltuk. Az oszlopot előzőleg 10 vegyes-% ammónium-szulfátot tartalmazó A-pufferrel eluáltuk. Az áramlási sebesség 1 ml/perc volt. A fehérjekoncentrációkat folyamatosan követtük A<sub>280</sub>-nál az oszlop eluálása közben. Az oszlopot 120 ml 10 vegyes-% ammónium-szulfátot tartalmazó A-pufferrel mostuk, mire A<sub>280</sub>-nál alaponalat kaptunk. A megkötődött fehérjéket 210 ml össztérfogatú, A-pufferben lévő, csökkenő ammónium-szulfát-gradienssel (10 vegyes-%-ról 0 vegyes%-ra) eluáltuk. 2 ml-es frakciókat gyűjtöttünk. Az egyes frakciókból 10 µl-es alikvotokat vettünk, és standard dicamba O-demetiláz-aktivitást mérő vizsgálati eljáráshoz (lásd fentebb) adtuk, kivéve azt, hogy nem-radioaktív dicambát alkalmaztunk szubsztrátként. A dicamba O-demetiláz-aktivitást úgy detektáltuk, hogy kézi UV-lámpával (312 nm, Fotodyne) sötét-szobában követtük a dicamba átalakulását a nagymértékben fluoreszcens reakciótermékké (3,6-DCSA-vá).

Ez az eljárás lehetővé tette a dicamba O-demetiláz felbontását három részre („pool”-ra), amelyek az elválasztott komponenseket (jelölésük I., II. és III. komponens) tartalmazták. Valamennyi komponens esszenciális volt a dicamba O-demetiláz aktivitáshoz (lásd lentebb). Ha az egyik komponens aktivitását vizsgáltuk, a másik két komponenst feleslegben adtuk hozzá. Egy típusú aktivitást tartalmazó frakciókat egyesítettük (I. komponens, 128-145. frakciók; II. komponens, nem kötődött 12-33. frakciók; III. komponens, 62-92. frakciók).

**(i) Az I. komponens tisztítása.** Az I. komponens aktivitását tartalmazó frakciókat (a Phenyl-Sepharose-oszlopról 0 M ammónium-szulfátnál eluálódott, 128-145. frakciók) egyesítettük, melyek össztérfogata 34 ml volt. Az egyesített mintákat 10 ml-re töményítettük centrifugálással, Centriprep-10 (Amicon) berendezés alkalmazásával, és azután Q-Sepharose (Fast Flow) FPLC-oszlopra (Pharmacia) vittük (2,5 x 6 cm), melyet A-pufferrel ekvilibráltunk és 80 ml A-pufferrel mostunk. Az oszlopra kötődött fehérjéket 100 ml, A-pufferben lévő, lineáris

KCl-gradienssel (0-tól 0,6 M-ig) eluáltuk, 1 ml/perc áramlási sebességgel. 1,5 percenként szedtünk frakciókat. Az I. komponens aktivitását mutató frakciókat (29-37.) egyesítettük, A-pufferrel szemben dializáltuk egy éjszakán át, 4°C-on, és MonoQ HR 5/5 FPLC anioncserélő oszlopra vittük A-pufferben. A fehérjét 1 ml/perc áramlási sebességgel eluáltuk 50 ml, növekvő koncentrációjú (0-0,5 M) KCl-gradiens alkalmazásával. Az I. komponens aktivitását mutató frakciókat (19-25.) egyesítettük és centrifugálással 0,4 ml-re töményítettük Centricon-10 berendezés alkalmazásával. A töményített mintát azután kromatográfiának vetettük alá Superose 12 FPLC-oszlopon (1,6 x 50 cm), 0,2 ml/perc áramlási sebességgel, 100 mM KCl-t tartalmazó A-puffer alkalmazásával. Az I. komponens aktivitását mutató, 7-10. frakciókat egyesítettük és centrifugálással töményítettük Centricon-10 berendezés alkalmazásával.

A részlegesen tisztított I. komponens hideg, 1 vegyes-%-os glicinnel hígítottuk és további háromszor centrifugálással töményítettük Centricon-10 berendezés alkalmazásával. A kisózott mintát azután 6 vegyes-%-os IEF-gélre (pH 4-6) vittük, és elektroforézisnek vetettük alá 1,5 óra hosszúra 4°C-on (lásd lentebb). Elektroforézis után a gél 25 mM hideg foszfát-pufferrel (pH 7,0) mostuk 5 percig, és azután a gélcsíkokat tartalmazó szeleteket kis darabokból álló kockákra (6 mm x 4 mm) vágtuk. A fehérjét úgy eluáltuk a kockákra vágott gélcsíkokból, hogy pipettaheggyel felaprítottuk azokat 10 µl 25 mM foszfát-puffer (pH 7,0) jelenlétében. Az egyes szegmensekből származó fehérjét összekevertük feleslegben lévő II. és III. komponenssel, és dicamba O-demetiláz-aktivitásra vizsgáltuk. Az I. komponens aktivitását mutató gélcsíkmintát (amelynek színe vörösesbarna is volt) 12,5 vegyes-% nátrium-dodecil-szulfátot tartalmazó poliakrilamid-gélre (SDS-PAGE) vittük a minta tisztaságának ellenőrzése céljából.

(ii) *A II. komponens tisztítása.* A Phenyl-Sepharose oszlopkromatográfiából kapott II. komponens A-pufferrel szemben dializáltuk egy éjszakán át, 4°C-on, és FPLC Q-Sepharose-oszlopra (2,5 x 6 cm) vittük. A mintaeluálás körülményei azonosak voltak a fentebb, I. komponensre leírtakkal, kivéve, hogy az elúciós gradiens 0-1 M KCl volt A-pufferben. A II. komponens aktivitását mutató frakciókat (30-37. frakciók) egyesítettük, A-pufferrel szemben dializáltuk, 0,4 ml-re töményítettük, és Superose 12 FPLC-oszlopra (1,6 x 50 cm) vittük. A mintafelvétel és az elúció eljárása azonos volt a fentebb, I. komponensre leírtakkal. A II. komponens aktivitását mutató (3-6.) frakciókat egyesítettük, azonos térfogatú A-pufferrel hígítottuk és MonoQ FPLC-oszlopra vittük. A fehérjét az oszlopról ugyanolyan KCl-gradiens alkalmazásával eluáltuk, mint az I. komponens esetén. A 20-25. frakciók mutatták a II. kom-

ponens aktivitását. A részlegesen tisztított II. komponenst tovább tisztítottuk IEF-elektroforézissel (pH 4-6), ugyanolyan körülményeket alkalmazva, mint az I. komponensre leírtak esetén. A II. komponens aktivitását mutató gélszegmenst 12,5 vegyes%-os SDS-PAGE-ra vittük további analízis céljára.

- 5           (iii) *A III. komponens tisztítása.* Phenyl-Sepharose oszlopkromatográfiából kapott III. komponenst A-pufferrel szemben dializáltuk egy éjszakán át, 4°C-on, és FPLC Q-Sepharose-oszlopra (2,5 x 6 cm) vittük. A körülmények azonosak voltak a fentebb, I. komponensre leírtakkal. A III. komponens aktivitását mutató frakciókat (26-38. frakciók) B-pufferrel [10 mM TRIS pH 7,5, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM EDTA, 5 térfogat-% glicerinn és 1 mM ditiotritol] szemben dializáltuk és 5 ml-re töményítettük. „Blue dye affinity matrix” [Cibacron Blue 3GA, type 3000 (Sigma)] töltöttünk egy FPLC-oszlopba (1 x 5 cm), és elő-ekvilibráltuk 20 ml B-pufferrel. A töményített III. komponenst a „Blue dye” oszlopra vittük, és 20 ml B-pufferrel mostuk 0,2 ml/perc áramlási sebességgel, ameddig az oszlopról lefolyó A<sub>280</sub> elérte az alapvonal szintjét. A kötött fehérjét azután 5 mM NADH-val eluáltuk B-pufferben. Reduktáz-aktivitást tartalmazó frakciókat úgy detektáltuk, hogy dicamba O-demetiláz aktivitásra vizsgáltunk feleslegben jelenlévő I. és II. komponensekkel, valamint úgy is, hogy az egyes frakciók képesek voltak-e DCIP-et redukálni NADH jelenlétében. A mindkét vizsgálat szerint erőteljes redukáz-aktivitással rendelkező frakciókat egyesítettük, 100 mM KCl-t tartalmazó A-pufferrel szemben dializáltuk, és felvittük Superose 12 FPLC-oszlopra. Ugyanolyan körülmények között végeztük a futtatást, mint azt az I. komponensre leírtuk. DCIP-redukciót katalizáló fehérjét tartalmazó frakciókat egyesítettük, A-pufferrel szemben dializáltuk és FPLC-MonoQ-oszlopra vittük. A fehérjéket ugyanolyan körülmények között eluáltuk, mint azt az I. komponensre leírtuk. Részlegesen tisztított III. komponenst tovább tisztítottuk IEF-gélelektroforézissel (pH 4-6). Az IEF-gélben, redukáz-aktivitással rendelkező fehérjéket úgy detektáltuk, hogy DCIP-redukciót vizsgáltunk agaróz-gélre fektetve, a fentebb leírtak szerint. A II. komponens aktivitását mutató gélszegmenst 12,5 vegyes%-os SDS-PAGE-ra vittük további analízis céljából.

- Amino-terminális aminosav-szekvenciák meghatározása.* Az IEF-gélekből kivágtuk a fehérjecsíkokat, és 12,5 vegyes%-os SDS-poliakrilamid-gél mintafelvivő helyeibe helyeztük. Elektroforézis után a tisztított fehérjéket tartalmazó gélseleteket PVDF-membránra (polivinilidén-difluorid, Millipore) blottoltuk „Trans-Blot cell” (Bio-Rad, Richmond, CA) berendezés alkalmazásával, 25 V-on, 16 óra hosszáig. A blottoló puffer 10 mM-os CAPS-ot [3-(ciklohexil-amino)-1-propánszulfonsav, pH 10,0] tartalmazó 20 tf%-os metanolos oldat volt.

A szekvenálást Applied Biosystems Inc. cégtől beszerzett, "420 H"-jelű készülékben végeztük Edman-lebontást alkalmazva [Edman és Henschen, S. B. Needleman (szerk.) "Protein sequence determination", 2. kiadás, Springer-Verlage (1975), New York].

**Fehérjekoncentráció meghatározása.** A fehérjekoncentrációkat Bradford módszere [Anal. Biochem. 72, 248-254 (1976)] szerint határoztuk meg, standardként marhaszérum-albumint alkalmaztunk.

**SDS-PAGE.** Nátrium-dodecil-szulfátot tartalmazó gélelektroforézist (SDS-PAGE) Laemmli [Nature 227, 680-685 (1970)] módosított módszere szerint hajtottuk végre. 85 x 65 x 0,75 mm-es, 12,5 vegyes-%-os SDS-géleket az alábbiak szerint készítettük el: futtató gél: 2,5 ml 40 vegyes-%-os akrilamid/bisz-akrilamid-oldat (37,5:1), 1 ml futtató puffer-oldat [3 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,8 vegyes-% SDS], 4,5 ml H<sub>2</sub>O, 5 µl TEMED és 40 µl 10 vegyes-%-os APS; mintagél: 0,5 ml 40 vegyes-%-os akrilamid/bisz-akrilamid-oldat, 0,5 ml mintagél-puffer-oldat [1 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,8 vegyes-% SDS], 3 ml H<sub>2</sub>O, 5 µl TEMED és 12,5 µl 10 vegyes-%-os APS. Az elektroforézis-puffer összetétele: 25 mM Tris-HCl (pH 8,3), 0,2 M glicin és 0,1 vegyes-% SDS. A mintapuffer 0,25 ml mintagél-puffert, 0,6 ml 20 vegyes-% SDS-t, 0,2 ml β-merkaptotetanolt és 0,95 ml 0,1 vegyes-% brómfenolkéket tartalmazott 50 térfogat-%-os glicerinnel. Az elektroforézist 80 V-on végeztük „Bio-Rad Mini Gel” készülékben, ameddig a nyomkövető festék 0,5 cm-re volt a gél anód felé eső végétől. A fehérjéket 0,1 vegyes-% Coomassie Brilliant Blue R-250-el festettük meg, amely izopropanol, víz és ecetsav 3:6:1 térfogat-arányú keverékében volt. A festéktelenítést metanol, víz és ecetsav 7:83:10 térfogat-arányú keverékében végeztük. A fehérjestandardek (Gibco BRL) az alábbiak voltak: miozin (214,2 kDa), foszforiláz-B (111,4 kDa), marhaszérum-albumin (74, 25 kDa), ovalbumin (45,5 kDa), szénsav anhidráz (29,5 kDa), β-laktoglobulin (18,3 kDa) és lizozim (15,4 kDa).

**Molekulatömeg meghatározása.** A peptidek molekulatömegét (M<sub>r</sub>) denaturáló körülmények között becsültük meg SDS-PAGE-analízis alkalmazásával. A I., II. és III. natív komponensek molekulatömegeit géliszűréssel határoztuk meg Superose 12 HR 10/30 FPLC-oszlopon (Pharmacia), 0,2 ml/perc áramlási sebességgel, 100 mM KCl-ot tartalmazó A-pufferben. A kalibráló fehérjék a Bio-Rad cégtől származó géliszűrő-standardek voltak: marhából származó tireoglobulin (670 kDa), marhából származó gamma globulin (158 kDa), csirkéből származó ovalbumin (44 kDa), lóbol származó mioglobín (17 kDa) és B-12-vitamin (1,35 kDa). A Superose 12 oszlop kizárási térfogatát Blue Dextran (M, 2.000.000, Sigma) alkalmazásával határoztuk meg.

**IEF.** Izoelektromos fókuszáló (IEF) gélelektroforézist vertikális, mini-gél készülékben (#MGV-100 modell, C.B.S. Scientific Co., Del Mar, CA) hajtottuk végre. IEF-géleket (70 x 90 x 1 mm) 6 vegyes-%-os poliakrilamiddal készítettünk az alábbi komponensek összekeverésével: 1,6 ml 30 vegyes-%-os akrilamid/bisz-akrilamid (37:5:1), 0,8 g glicerint, 0,32 ml ampholyte pH 4-6 (Serva), 0,08 ml ampholyte pH 4-9 (Serva), 5,2 ml H<sub>2</sub>O, 10 µl TEMED és 80 µl 10 vegyes-%-os APS. A katódpuffer 100 mM β-alanin és az anódpuffer 100 mM ecetsav volt. Körülbelül 1-10 µl 1 vegyes%-os glicinben lévő fehérjemintákat összekevertünk azonos térfogatú mintapufferrel [50 térfogat-%-os glicerint, 1,6 térfogat-%-os ampholyte pH 4-9, 2,4 térfogat-%-os ampholyte pH 4-6]. A mintákat a gél katód felőli végénél vittük fel, és 200 V-on vándoroltattuk azokat 1,5 óra hosszáig és 400 V-on további 1,5 óráig. A fehérjéket Coomassie Brilliant Blue R-250 alkalmazásával festettük meg, fentebb, az SDS-poliakrilamid-gélekre leírtak szerint. Az IEF-markerek (Sigma) a következők voltak: amiloglikozidáz, pI 3,6; glükóz oxidáz, pI 4,2; tripszin-inhibitor, pI 4,6; β-laktoglobulin-A, pI 5,1; szénsav anhidráz-II, pI 5,4; szénsav anhidráz-II, pI 5,9 és szénsav anhidráz-I, pI 6,6.

**Kinetikai analízis.** Dicamba O-demetiláz által katalizált demetilálási reakció kinetikáját kezdeti reakciósebességek analizálásával tanulmányoztuk, állandó enzimkoncentráció jelenlétében és a szubsztrát (dicamba) koncentrációját növelve. A reakciókeverékek 25 mM kálium-foszfát-puffert (pH 7,0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>-ot, 0,5 mM NADH-t, 0,5 mM FeSO<sub>4</sub>-et, 25 µg részlegesen tisztított O-metiláz-enzimet (a 40 vegyes-% és 70 vegyes-% közötti telítettség között kicsapódott ammónium-szulfát-frakciót tiszta sejtlizátumból), különböző koncentrációjú (0,5-50 µM) dicambát és különböző koncentrációjú [<sup>14</sup>C]-dicambát (U-fenil-<sup>14</sup>C, 42,4 mCi/mmol) tartalmaztak 300 µl össztérfogatban. Azokban a vizsgálati eljárásokban, ahol 0,5 µM és 1 µM közötti dicamba-koncentrációkat alkalmaztunk, a reakciótérfogatot 900 µl-re növeltük, hogy elegendő mennyiségű radioaktív dicamba és metabolitjai álljanak rendelkezésre a detektálás lehetővé tételét biztosítva. Ezekben a kísérletekben a reakcióban lévő más komponensek mennyiségét megháromszoroztuk. A [<sup>14</sup>C]-dicamba konverzióját [<sup>14</sup>C]-3,6-DCSA-vá különböző időpontokban határoztuk meg, valamennyi alkalmazott dicamba-koncentráció esetén, PhosphorImager SF alkalmazásával, amely radioaktivitásra képes pásztázni foszfor-ernyőkön, amelyeket TLC-lemezek hatásának tettük ki 24 óra hosszáig. Egy egység aktivitást akkora enzim-mennyiségként definiálunk, amely 1 nmol 3,6-DCSA-t állít elő percenként 30°C-on. Az egyes reakciók kezdeti sebességét a reakciósebesség idő függvényében felvett görbéjén határoztuk meg az egyes szubsztrátkoncentrációk esetén. Az adatokat Michaelis-Menten-kinetika

szerint modelleztük, és a  $K_m$  és  $V_{max}$  értékeket Lineweaver-Burk-görbék illesztésével határoztuk meg SigmaPlot® (Jandel Scientific, Corte Madera, CA) alkalmazásával.

**Oxigénigény.** Előzetes kísérletekben Clark-oxigénelektród alkalmazásával mértük az oxigénfogyasztást standard dicamba O-demetiláz vizsgálati eljárásban, szubsztrátként dicambát alkalmazva. A dicamba O-demetiláz által katalizált, dicamba O-demetilálás oxigénigényének igazolása céljából reakciókat végeztünk anaerob kamrában, amely 1 ppm-nél kevesebb oxigént tartalmazott. Az oxigén kiszorítását a reakciókeverékből 4°C-on végeztük. Enzimet nem tartalmazó reakciókeverékeket egy reakcióedénybe helyeztünk, és gumírozott kupakkal lezártuk. Az oxigén kiszorításához az edényt evakuáltuk kétszer vákuummal és minden egyes alkalommal nitrogént áramoltattunk át rajta. A harmadik evakuálás után az edényen 90% nitrogént és 10% hidrogént tartalmazó gázkeveréket áramoltattunk át. Az enzimdátból ehhez hasonlóan kihajtottuk az oxigént (ügyeltünk arra, hogy az enzimdátot ne buborékoltsuk). A reakciókeverékeket és az enzimdátot egyaránt anaerob kamrába (95% nitrogént és 5% hidrogént tartalmazó atmoszféra) vittük át. Kétszáz mikroliter tiszta sejtlizátumot injektáltunk a gumírozott kupakon át egy mikrofecskendővel, és gyengéden összekevertük 960  $\mu$ l oxigénmentes reakciókeverékkel. A reakciókat 30°C-on végeztük.

A reakciótermékeket TLC-lemezeken vizsgáltuk, ami azt mutatta, hogy a [ $^{14}$ C]-3,6-DCSA-képződés sebessége [ $^{14}$ C]-dicambából anaerob körülmények között szignifikánsan kisebb volt, mint a reakciósebesség ugyanennyi enzimmennyiséget alkalmazva aerob körülmények között. Anaerob körülmények között látszólag nem volt dicamba átalakulás 3,6-DCSA-vá 1 órán belül. Viszont párhuzamos reakciókeveréket véve az anaerob kamrából 30 perc múlva és levegővel inkubálva a dicamba O-demetiláz-enzimkomplex egyik komponense szignifikáns mennyiségben oxigenáz volt.

Megjegyezhetjük, hogy a [ $^{14}$ C]-dicamba *in vitro* konverziója [ $^{14}$ C]-3,6-DCSA-vá hasonló módon történik, mint a korábban leírt *in vivo* konverzió [Cork és Kreuger, Adv. Appl. Microbiol. **36**, 1-66 (1991); Yang és mtsai., Anal. Biochem. **219**, 37-42 (1994)]. Ezekben a kísérletekben a DCSA-t reakciótermékként azonosították TLC-vel és kapilláris elektroforézissel egyaránt. A DCSA-t meggyőzően azonosították a dicamba-lebontás az első fő termékeként mind *in vivo*, mind *in vitro* gázkromatográfia és tömegspektrometria alkalmazásával.

**Komponens- és kofaktorigények.** A dicamba O-demetiláz három komponensének phenyl-sepharose oszlopkromatográfiával végzett első elválasztása után a részlegesen tisztított preparátumokat egyenként további tisztításnak vetettük alá Q-Sepharose oszlopon (2,5 x 6

cm). A mintákat Q-Sepharose (Fast Flow) FPLC-oszlopra (Pharmacia) vittük A-pufferben, és 100 ml 0-0,6 M KCl-gradienssel (az oxigenáz-komponensre) vagy 0-1,0 M KCl-gradienssel (a ferredoxin és a reduktáz komponensekre) eluáltuk, 1,5 ml-es frakciókat szedve. Az egyes oszlopokról származó, megfelelő egyesített frakciókat (oxigenáz-tisztításból a 29-37. frakciókat, ferredoxin-tisztításból a 30-37. frakciókat vagy a reduktáz-tisztításból a 26-38. frakciókat) használtuk a komponens- és kofaktorigények meghatározására.

A három komponens O-demetiláz-aktivitásra vizsgáltuk különböző kombinációkban, a komponensek igényeinek meghatározása céljából.

A kofaktorigények meghatározása céljából az O-demetiláz-aktivitást vizsgáltuk a három komponens és [ $^{14}$ C]-dicamba keverékének alkalmazásával, 30 percig, 30°C-on. A reakciókeverékben lévő (optimalizált arányt biztosítva), részlegesen tisztított fehérje mennyiségei: 85 µg oxigenáz, 55 µg ferredoxin és 50 µg reduktáz. Az alkalmazott kofaktorok koncentrációi a reakciókeverékben: 0,5 mM NADH, 0,2 mM FAD, 0,5 mM FeSO<sub>4</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM NADPH és 0,2 mM FMN.

## EREDMÉNYEK

**I. komponens.** A dicamba O-demetiláz Phenyl-Sepharose-oszlophoz legerősebben kötődő komponense (eleinte I. komponensnek, azt követően oxigenáznak jelöltük) jól megkülönböztethetően vörösesbarna színű volt. Ez vas-kén klaszter(ek)e)t vagy hem-csoporto(ka)t tartalmazó fehérje (fehérjék) potenciális jelenlétét jelzi. A Phenyl-Sepharose-oszlopról származó, I. komponens aktivitásával rendelkező frakciókat további tisztításnak vetettük alá Q-Sepharose (Fast Flow) és MonoQ-kromatográfiával, és azután Superose 12-t alkalmazó, méretkizáráson alapuló elválasztásnak vetettük alá. Az I. komponensnek megfelelő fehérjét azután IEF-gélben tisztítottuk tovább.

Az IEF-gél legjelentősebb csíkjából (látszólagos pI körülbelül 4,6) származó fehérjét kivágtuk és SDS-PAGE-val megtisztítottuk a megmaradt kisebb szennyeződésektől. A IEF-el végzett tisztítással után, az I. komponensnek megfelelő fehérje tisztasága 90%-nál nagyobb volt, melyet Coomassie Blue-val megfestett SDS-poliakrilamid-gél denzitometriás analízisével határoztunk meg.

Meghatároztuk a körülbelül 40.000 Dalton látszólagos molekulatömegű, domináns fehérje N-terminális aminosav-szekvenciáját. Az aminosav-szekvenálás eredményei azt mutatják, hogy az N-terminális régió első 29 aminosavja az alábbi szekvencia (a zárójelben lévő csoportok a legvalószínűbb csoportok):

Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu Glu Leu Ser Glu Lys Pro  
Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp (Asp vagy Thr) (Pro)

(1. azonosítószámú szekvencia).

Különböző adatbázisokban lévő szekvenciákkal való összehasonlítás kevés homoló-  
giát mutatott, vagy egyáltalán nem mutatott homológiát más, leírt monooxygenázok vagy  
5 dioxigenázok amino-terminális szekvenciáival.

**II. komponens.** Phenyl-Sepharose oszlophoz nem kötődött fehérje-frakciót II. kom-  
ponensnek jelöltük. Mivel ez a sárgás színű frakció helyettesíthető volt *Clostridium*  
*pasteurianum*ból származó ferredoxinnal (de lassúbb reakciósebességgel), amikor a vizsgálati  
10 eljárásokban az I. és III. komponensekkel kombinációban végeztük, próbaképpen ferredoxin-  
tartalmú frakcióként jelöltük. A *Clostridium*ból származó ferredoxin egyértelműen működött a  
II. komponens helyett, de azt véve, hogy a II. komponens igen szennyezett volt ezekben a ki-  
sérletekben, a *Clostridium*ból származó enzim hatékonysága szignifikánsan alacsonyabb volt,  
mint a DI-6-törzsből származó feltételezett ferredoxin. Konkrét esetben, 55 µg részlegesen  
15 tisztított II. komponenst összekevertünk feleslegben hozzáadott I. és III. komponenssel, amely  
a dicamba 3,6-DCSA-vá alakulását körülbelül 5 nmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> sebességgel katalizálta, míg  
100 µg *Clostridium*ból származó, nagymértékben tisztított ferredoxin csak 0,6 nmol min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>  
aktivitást eredményezett.

Q-Sepharose (Fast Flow) kromatográfiát, Superose 12 géliszűrést és MonoQ-  
20 kromatográfiát magában foglaló tisztítási lépésekkel körülbelül egy milligramm tisztított fehér-  
jéhez jutottunk 25 gramm kiindulási nedves sejtől. Ezt a frakciót hasonló módon tisztítottuk,  
mint az oxigenáz-komponent elektrofórezis alkalmazásával, IEF-gélben és azt követően az ak-  
tív IEF-frakció SDS-polakrilamid-gélben végzett elektrofórezisével.

A II. komponens aktivitásának analízise az IEF-gél szegmenseiről eluált fehérjékben  
25 azt mutatta, hogy körülbelül pI 3,0-al rendelkező frakció tartalmazta az aktív fehérjét a II.  
komponensben. Ezen gélseletről eluáltuk a fehérjét és SDS-PAGE-ra vittük. A gél Coomassie  
Blue-val való megfestése egy szembetűnő fehérjecsíkot (körülbelül 28.000 Dalton molekula-  
tömegű) hozott elő az elkenődött, alacsony molekulatömegű fehérjék között.

**III. komponens.** A dicamba O-demetiláz III. komponense kötődött a Phenyl-  
30 Sepharose-oszlophoz magas ammónium-szulfát koncentrációban, és körülbelül 4 vegyes-%  
ammónium-szulfát-koncentrációnál eluálódott. Ezt a világossárga frakciót próbaképpen  
reduktázt tartalmazó frakcióként azonosítottuk az alapján, hogy képes volt oxidált citokró-m-c-  
t és DCIP-t redukálni NADH jelenlétében, és mivel helyettesíthető volt sertésszívből származó

citokró-m-c reduk-tázzal (Type I, Sigma) I. és II. komponens-t tartalmazó vizsgálati eljárások-ban. Ebben a reakció-sorozatban 50 µg részlegesen tisztított III. komponens alkalmazásával körülbelül 5 nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> reakciósebességet értünk el, ha azt feleslegben lévő I. és II. komponens-sel kevertük össze. A nagymértékben tisztított citokró-m-c reduk-táz körülbelül 2,5 nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> specifikus aktivitást mutatott a reakcióban, amely aktivitás jóval az alatt volt, amit a III. komponens mutatott, ha figyelembe vesszük ezen vizsgálati eljárásokban alkalmazott, nyers III. komponens szennyezett állapotát. Továbbá, a III. komponens reduk-táz-aktivitást mutatott, ha citokró-m-c-vel vagy 2,6-diklór-fenol-indofenollal (DCPIP) inkubáltuk NADH jelenlétében. Sem az I. komponens, sem a II. komponens nem mutatott aktivitást ebben a két reduk-tázt vizsgáló eljárásban.

A frakció további kromatográfiás tisztítása Q-Sepharose-t (Fast Flow), „blue dye affinity matrix”-ot, Superose 12-t és MonoQ-töltetet tartalmazó oszlopokon kis mennyiségű fehérjét eredményezett a reduk-táz-aktivitással rendelkező frakciókban. A III. komponensnek megfelelő fehérje tisztasága körülbelül 70%-os volt, melyet az aktív fehérjefrakció denzitometriás analizisével határoztunk meg SDS-PAGE-n való elválasztás és Coomassie Blue-val való festés után.

A III. komponens további tisztítása közben azt találtuk, hogy a MonoQ-oszloppal végzett lépés után két különböző fehérjefrakció tartalmazott reduk-táz-aktivitást, ha azt a ferredoxin- és oxigenáz-komponensekkel együtt vizsgáltuk. Ezen két frakció további tisztítása IEF-gélén végzett elektroforézissel kiderítette, hogy a két frakció reduk-táz aktivitása jól megkülönböztethetően eltérő izoelektromos ponttal rendelkezik. Ezt úgy mutattuk ki, hogy az IEF-gélből származó, két reduk-táz-frakciót tartalmazó egyes sávokat kivágtuk, és a kivágott szeleteket DCIP-reakciókeveréket tartalmazó, alacsony olvadáspontú agaróz-párnára tettük. Mindkét gélselethen azonosítottunk reduk-táz-aktivitást a DCIP NADH-függő redukciója által, amelyben az szintelen, redukált formába alakult. A 35. frakcióban lévő reduk-táz körülbelül 5,6 látszólagos pI-vel rendelkezett, míg a 27. frakcióból származó reduk-táz körülbelül 4,8 látszólagos pI-vel rendelkezett.

Az IEF-gélből származó, mindkét reduk-táz-aktivitás instabil volt, és kis mennyiségben volt jelen. Valóban, csak a MonoQ-oszlopról eluált 35. frakcióból származó reduk-tázban maradt elegendő fehérjekoncentráció és aktivitás a további tisztításhoz és jellemzéshez. Ezt a reduk-táz-aktivitást tartalmazó IEF-gél-selethe-ből a fehérjét eluáltuk és SDS-PAGE-val elválasztottuk a szennyező fehérjéktől. Ezen a gélen egy kiemelkedő fehérje tömege körülbelül 45.000 Dalton. Méretkizárásra alapuló kromatográfia azt mutatta, hogy a III. komponens mo-

lekutatömege körülbelül 50.000 Dalton natív állapotában.

**Dicamba O-demetiláz biokémiai jellemzése.** Dicamba O-demetiláz-aktivitást in vitro inkubálások alatt mértünk 20° és 50°C közötti hőmérséklet-tartományban és körülbelül 6 és 9 közötti pH-n. Az aktivitás éles maximuma volt 30°C-nál, valamint szélesen elnyújtva 6,5 és 7,5 közötti pH-értékeken. Az enzimaktivitás az alkalmazott pH-puffer típusától függ. Például pH 7,0-en az aktivitás körülbelül 40%-al alacsonyabb Tris-tartalmú pufferben, mint foszfát-tartalmú pufferben.

A  $K_m$ - és  $V_{max}$ -értékeket dicamba O-demetilázra két párhuzamos kísérletből származó adatokra illesztett Michaelis-Menten- és Lineweaver-Burk-görbékből határoztuk meg, SigmaPlot® alkalmazásával. A dicamba  $K_m$ -értékét körülbelül  $9,9 \pm 3,9 \mu M$ -nak becsültük és a reakció  $V_{max}$ -értékét körülbelül  $108 \pm 12$  nmol/perc/mg-nak becsültük.

A három komponens dicamba O-demetiláz-aktivitásra vizsgáltuk különböző kombinációkban. Egyik komponens sem mutatott aktivitást, ha egymagában vizsgáltuk. Valóban, szignifikáns mennyiségű O-demetiláz-aktivitást csak akkor lehetett detektálni, ha mindhárom komponens kombináltuk. Az I. és II. komponens keveréke kis mennyiségű enzimaktivitást mutatott, amely valószínűleg a I. komponens frakciói által szennyezésként tartalmazott III. komponens nyomokban való jelenlétének tulajdonítható.

A NADH és a NADPH egyaránt hozzájárult az enzim aktivitásához, a NADH jelentősen hatékonyabban, mint a NADPH.  $Mg^{2+}$  szükséges volt az enzimaktivitáshoz.  $Fe^{2+}$ , flavin-adenin-dinukleotid (FAD) és flavin-mononukleotid (FMN) kis stimuláló hatást mutatott, vagy egyáltalán nem stimulálta az enzimaktivitást, részlegesen tisztított fehérjepreparátumokkal végzett kísérletekben. A legmagasabb aktivitást NADH,  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  és FAD kombinációjával kaptuk.

## DISZKUSSZIÓ

*Pseudomonas maltophilia* DI-6-törzsből származó dicamba O-demetiláz egy három-komponensű oxigenáz [Wang, X-Z., Ph.D. thesis (1996), University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, NE], amely a dicamba nevű herbicid 3,6-diklór-szalicilsavvá (3,6-DCSA; 2-hidroxi-3,6-diklór-szalicilsav) való átalakulásáért felelős. Tisztítási vázlatot terveztünk, amely lehetővé tette mindhárom komponens homogén vagy közel homogén állapotba való tisztítását.

A három komponens első elválasztása Phenyl-Sepharose-oszlopon végzett kromatográfia volt. A részlegesen tisztított komponensek enzimaktivitásai és más jellemzői lehetővé tették a komponensek feltételezett azonosítást reduktázként, ferredoxinként és oxigenázként,

amely ahhoz hasonló összetétel, amelyet számos más, korábban tanulmányozott hem-tartalmú és hemet nem tartalmazó, többkomponensű oxigenáz esetén találtak [Batie és mtsai., "Chemistry and biochemistry of flavoenzymes" című könyvben, III. kötet, 543-565. old., szerk. F. Müller, CRC Press, Boca Raton; Harayama és mtsai., Annu. Rev. Microbiol. 46, 565-601 (1992); Mason és Cammack, Annu. Rev. Microbiol. 46, 277-305 (1992); Rosche és mtsai., Biochem. Biophys. Acta 1252, 177-179 (1995)]. A Phenyl-Sepharose-oszlopról izolált III. komponens mind a citokróm-c, mind a DCIP-festék NADH-függő redukcióját katalizálta. Továbbá az a képessége, hogy elősegíti a dicamba konvertálását 3,6-DCSA-vá, ha I. és II. komponenssel kombináljuk, részben helyettesíthető citokróm-c reduktázzal. A II. komponens helyettesíthető *Clostridium pasteurianum*-ból származó ferredoxin hozzáadásával az I. és III. komponens tartalmazó reakciókban. Az O-demetilálási reakciók elősegítéséhez a molekuláris oxigén abszolút szükségessége azt jelzi, hogy a fennmaradt komponens oxigenáz.

**Oxigenáz<sub>DIC</sub>.** A dicamba O-demetiláz I. komponensét (oxigenáz<sub>DIC</sub>-nek jelöljük) homogenitással tisztítottuk, és N-terminális aminosav-szekvenálásnak vetettük alá. Az eredményül kapott, 29 aminosavból álló szekvencia nem mutatott szignifikáns homológiát semmilyen más, különböző adatbankokban rendelkezésre álló fehérjeszekvenciával. Azonban ebből az aminosav-szekvenálásból származó információk lehetővé tették olyan degenerált oligonukleotid-próbák tervezését, amelyeket sikeresen alkalmaztunk az I. komponens génjének detektálására és klónozására (lásd 2. példát). Továbbá, ezen klón nukleotidszekvenciájából származó aminosav-szekvencia összehasonlítása az adatbázisokban lévő fehérjeszekvenciákkal erős homológiát mutatott más oxigenázokkal (lásd 2. példát).

Az oxigenáz<sub>DIC</sub> látszólagos molekulatömege SDS-poliakrilamid-gélekben való migrációja alapján körülbelül 40.000 Daltonnak becsülhető. Tisztított oxigenáz-preparátumok csak egy fő sávot mutattak Coomassie Blue-val festett SDS-poliakrilamid-géleken, és ebben a csíkban lévő fehérje Edman-lebontása csak egy N-terminális fajta jelenlétét mutatta. A natív oxigenáz<sub>DIC</sub> méretkizáráson alapuló oszlopon való viselkedésére alapuló becslések szerint a molekula mérete körülbelül 90.000 Dalton. Ezen valamennyi eredmény alapján feltételezzük, hogy a natív oxigenáz homodimerként fordul elő.

Számos, többkomponensű rendszer oxigenáz/hidroxiláz komponense ( $\alpha\beta$ )<sub>n</sub>-típusú alegység-elrendeződést mutat, amelyben a nagyobb  $\alpha$ -alegység mérete körülbelül 50.000 Dalton, és a kisebb  $\beta$ -alegység molekulatömege körülbelül 20.000 Dalton [Harayama és mtsai., Annu. Rev. Microbiol. 46, 565-601 (1992)]. Ezzel ellentétben úgy tűnik, hogy a dicamba O-

demetiláz oxigenáz-komponense egyetlen, körülbelül 40 kDa molekulatömegű alegységgel rendelkezik, amely valószínűleg dimerként fordul elő natív állapotában. Ez az ( $\alpha$ )<sub>2</sub>-típusú alegység-elrendeződés hasonló ahhoz, amit más, jól jellemzett oxigenáz esetén találtak, például *Pseudomonas* sp. CBS-törzsből származó, 4-klór-fenil-acetát 3,4-dioxigenáz [Markus és mtsai., J. Biol. Chem. **261**, 12883-12888 (1986)], *Pseudomonas cepacia*-ból származó ftalát-dioxigenáz [Batie és mtsai., J. Biol. Chem. **262**, 1510-1518 (1987)], *Comamonas testosteroni*-ből származó 4-szulfobenzoát 3,4-dioxigenáz [Locher és mtsai., Biochem. J. **274**, 833-842 (1991)], *Pseudomonas putida* 86-ből származó 2-oxo-1,2-dihidro-kinolin 8-monooxigenáz [Rosche és mtsai., Biochem. Biophys. Acta **1252**, 177-179 (1995)], *Pseudomonas pseudoalcaligenes*-ből származó 4-karbonil-difenil éter-dioxigenáz [Dehmel és mtsai., Arch. Microbiol. **163**, 35-41 (1995)] és *Pseudomonas putida*-ból származó 3-klór-benzoát 3,4-dioxigenáz [Nakatsu és mtsai., Microbiology (Reading) **141**, 485-495 (1995)] esetén.

**Ferredoxin<sub>DIC</sub>**. A dicamba O-demetiláz II. komponensét (ferredoxin<sub>DIC</sub>) néhány oszlopkromatográfiás lépéssel és IEF alkalmazásával tisztítottuk. SDS-PAGE-val végzett utolsó tisztítás egy fő fehérjecsíkot adott ( $M_r$  kb. 28.000) és valamivel kisebb fehérjék kenődése volt látható.

Meghatároztuk a 28.000 Dalton látszólagos molekulatömegű fehérje N-terminális aminosav-szekvenciáját. Ez az aminosav-szekvencia lehetővé tette degenerált oligonukleotid-próbák előállítását, és ezeket a próbákat alkalmaztuk a fehérjét kódoló genomi klón izolálására. Bár a klón által termelt fehérje ferredoxin (ferredoxin<sub>28kDa</sub>) volt, ezt követően meghatároztuk, hogy nem aktív dicamba-lebontásban, ha dicamba O-demetiláz másik két komponensével kombináljuk (az adatokat nem mutatjuk be).

Más bizonyítékok alátámasztják azt a következtetést, hogy a ferredoxin<sub>28kDa</sub> nem a dicamba O-demetiláz ferredoxin-komponense volt. Az első, hogy a fehérje molekulatömege (28 kDa) jelentősen magasabb, mint baktériumokból származó többkomponensű oxigenázokban található, más ferredoxinok molekulatömege (azaz 8-13 kDa) [Batie és mtsai., "Chemistry and biochemistry of flavoenzymes" című könyvben (szerk. F. Müller), III. kötet, 543-565. old., CRC Press, Boca Raton; Harayama és mtsai., Annu. Rev. Microbiol. **46**, 565-601 (1992)].

Másodszor, ferredoxin<sub>28kDa</sub>-ból származó, 20 aminosavból álló N-terminális szekvencia különböző fehérje-adatbázisokban lévő, más aminosav-szekvenciákkal való összehasonlítása [Genetics Computing Group (GCG) szoftvercsomagját alkalmazva (University of Wisconsin, Madison, WI)] nagymértékű homológiát (80-85% azonosság a legvalószínűbb N-terminális

ferredoxin<sub>28kDa</sub>-szekvenciához viszonyítva) mutatott ki számos kétklasztteres, bakteriális ferredoxinnal (*Pseudomonas stutzeri*ből, *Pseudomonas putida*ból, *Rhodobacter capsulatus*ból és *Azotobacter vinelandii*ből származó ferredoxinokkal).

A négy, ferredoxin<sub>28kDa</sub>-al erős homológiát mutató diklasztteres ferredoxin [3Fe-4S]-  
 5 klaszterrel rendelkezik, melyet egy [4Fe-4S]-klaszter követ a fehérje N-terminálisánál. Ez alapján feltételezzük, hogy a ferredoxin<sub>28kDa</sub> jelentősen különbözik a [2Fe-2S]-klaszterekkel rendelkező ferredoxin-komponensektől, melyek rendszerint heket nem tartalmazó, többkomponensű oxigenázokkal asszociáltak [Harayama és mtsai., Annu. Rev. Microbiol. 46, 565-601 (1992); Mason és Cammack, Annu. Rev. Microbiol. 46, 277-305 (1992); Rosche és mtsai.,  
 10 Biochem. Biophys. Acta 1252, 177-179 (1995)].

**Reduktáz<sub>DIC</sub>.** A dicamba O-demetiláz III. komponens (reduktáz<sub>DIC</sub>-nek jelöltük) tisztítása volt a legnehezebb a három komponens közül. Ez részben a látszólagos instabilitásnak és a DI-6-törzs lizátumaiban való alacsony előfordulási gyakoriságnak volt tulajdonítható. Mindezek ellenére elegendő mennyiségű fehérjét tisztítottunk ahhoz, hogy megbecsüljünk egy közeli  
 15 lítő molekulatömeget, amely 45.000 Dalton volt. Ez hasonló volt a méretkizáráson alapuló kromatográfiával meghatározott molekulatömeghez, amely 50.000 Dalton volt, és ez alapján feltételeztük, hogy a reduktáz<sub>DIC</sub> natív formájában monomerként fordul elő. A reduktáz-komponens tisztítását tovább bonyolította, hogy a MonoQ-oszlopon végzett kromatográfia és az IEF a tisztított reduktáz-preparátumokat felbontotta két, látszólag eltérő pI-értékkel rendelkező  
 20 aktivításra. A MonoQ-oszlopról származó mindkét frakció működőképes volt ferredoxin<sub>DIC</sub>-el és oxigenáz<sub>DIC</sub>-el való kombinációban dicamba O-demetiláz-aktivitás létrehozására. Két hasonló flavoprotein található *Sphingomonas* fajhoz tartozó RW1-törzsben, amelyek mindegyike egyformán jól működik reduktáz-komponensként a háromkomponensű dibenzofurán 4,4a-dioxigenázban, melyet a közelmúltban írtak le [Bünz és Cook, J. Bacteriol. 175, 6467-  
 25 6475 (1993)]. Érdekes, hogy mindkét reduktáz 44.000 Dalton molekulatömegű volt, amely nagyon hasonlóan a reduktáz<sub>DIC</sub> 45.000 Dalton molekulatömegéhez. Több komponensre figyeltek meg a farkasbab (csillagfürt) gyökérsomóiban előforduló leghemoglobin reduktáz esetén is izoelektromos fókuszálási technikát alkalmazva [Tupunov és mtsai., Biokhimiya (angol kiadás) 162, 378-379 (1982)]. Ebben az esetben az IEF alkalmazásával négy, elkülöníthető kom-  
 30 ponensre mutattak ki, amelyek NADH-függő reduktáz-aktivitással rendelkeztek. A kérdés megoldása céljából, vagyis hogy vajon csak egy reduktáz<sub>DIC</sub> létezik, amely két formában fordul elő, vagy két, különböző reduktáz létezik a DI-6-törzsben, egy javított eljárás kifejlesztésére van szükség a fehérje nagyobb mennyiségben való izolálására és/vagy a kérdéses gén(ek)

klónozására és szekvenálására (lásd 3. és 5. példát).

**Dicamba O-demetiláz tulajdonságai.** A fentebb leírt egyedi komponensek fizikai és biokémiai tulajdonságain kívül, az enzimaktivás analízisével kimutattuk, hogy az O-demetiláz-rendszer erős affinitást ( $K_m$  kb. 10  $\mu$ M) mutat szubsztrátja irányában, és  $V_{max}$ -értéke körülbelül 100-110 nmol/perc/mg. Ahogyan az mérsékelt időjárási zónában gyűjtött talajbaktérium esetén várható volt, a maximális enzimaktivitást 30°C hőmérséklet körül figyeltük meg. Míg az enzimrendszer pH-optimuma 6,5-7,5 pH-tartományban volt, egy adott enzimpreparátummal mért aktivitást erősen befolyásolta az alkalmazott pH-pufferrendszer típusa. Tris-puffer jelenlétében mért enzimaktivitás legalább 40%-al alacsonyabb volt, mint foszfát-pufferben mérve ugyanazon a pH-n.

A dicamba O-demetiláz három komponense által katalizált reakció vázlatát az 1. ábrán mutatjuk be. Az elektronok a NADH-ról jutnak reduktázból és ferredoxinból álló rövid elektrontovábbító láncra a terminális oxigenázig, amely katalizálja a dicamba oxidációját. A dicamba O-demetiláz és számos többkomponensű dioxigenáz közötti hasonlóságok alapján feltételezzük, hogy a dicamba O-demetiláz potenciálisan rejtett dioxigenáz-aktivitással rendelkezhet. Azonban nyilvánvaló, hogy ez az enzim nem tartozik a dioxigenázok osztályába, amelyek  $O_2$ -t hasítanak, és egy atom oxigént építenek be a fő-szubsztrátba és más, kis szerves szubsztrátba, például  $\alpha$ -ketoglutarátba [Fukumori és Hausinger, J. Biol. Chem. **268**, 24311-24317 (1993)]. Valóban, nagymértékben tisztított reduktáz<sub>DIC</sub>, ferredoxin<sub>DIC</sub> és oxigenáz<sub>DIC</sub> kombinációja csak  $O_2$ -t, NADH-t,  $Mg^{2+}$ -t,  $Fe^{2+}$ -t és dicambát igényel az aktivitáshoz.

## 2. példa

### **Pseudomonas maltophilia DI-6-törzsből származó dicamba O-demetilázban lévő oxigenázt kódoló klón azonosítása és szekvenálása**

Az 1. példába leírtak szerint meghatároztuk az oxigenáz<sub>DIC</sub> N-terminális aminosav-szekvenciájának első 29 aminosavját (a zárójelbe tett csoportok a legvalószínűbbek):

Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu Glu Leu Ser Glu Lys  
Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp (Asp vagy Thr) (Pro)

(1. azonosítószámú szekvencia).

Ez a szekvencia lehetővé tette degenerált oligonukleotid-próbák tervezését, amelyeket az Operon cég (Alameda, CA) szintetizált. Konkrétan, 32 próbából álló keveréket alkalmaztunk, amely próbák mindegyike 17 nukleotid hosszúságú volt, és az összes lehetséges

nukleotidszekvenciát tartalmazta, amely a fentebb vastag betűvel kiemelt aminosav-szekvenciát (Xaa-ként Cys-t alkalmaztunk) kódolhatja. Az oligonukleotid-próbák 3'-végükön digoxigeninnel (DIG) voltak jelölve a Boehringer Mannheim cég (Indianapolis, IN) által megadott utasítások szerint.

5 A DIG-jelölt próbákat először *P. maltophilia* DI-6-ból származó genomi DNS-hez hibridizáltattuk, amelyet különböző kombinációjú restrikciós enzimekkel emésztettünk, 1%-os agaróz-gélben megfuttattuk, és nylon-szűrőre blottoltuk. Ezen eredmények alapján, méret szerint frakcionált genomi könyvtárát állítottunk elő pBluescript II KS+ vektorban, és *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  kompetens sejtekbe transzformáltuk. A genomi könyvtár 1-2 kb méretű  
10 XhoI/HindIII-fragmenseket tartalmazott. A DIG-jelölt oligonukleotid-próbákat egy sorozat nylon-szűrőkre felvitt bakteriumklónhoz hibridizáltattuk. A pozitív kolóniákból plazmid-DNS-t izoláltunk és szubklónoztuk. Valamennyi szubklón mindkét szálát szekvenáltuk az „University of Nebraska-Lincoln” DNS-szekvenáló berendezésén. A DIG-jelölt próbák hibridizátását és detektálását a Boehringer Mannheim cég eljárása szerint végeztük.

15 Azonosítottuk az oxigenáz<sub>DIC</sub>-et kódoló genomi DNS-klont. Az egész oxigenáz<sub>DIC</sub>-et kódoló nukleotidszekvenciát és a levezetett aminosav-szekvenciát 2. és 3. azonosítószámú szekvenciaként mutatjuk be, lentebb a szekvencialistában.

A klón nukleotidszekvenciájából származó aminosav-szekvencia és a „Swiss Protein Database”-ban lévő fehérjeszekvenciák összehasonlításával homológiát mutattunk ki más oxigenázokkal. A homológiát GCG-szoftvercsomag FASTA-programjának alkalmazásával határoztuk meg. A legnagyobb mértékű homológiát vanillát demetiláz (*Pseudomonas* sp., 19151. számú ATCC-törzsből származó) oxigenáz-komponensével találtunk, amely 33,8%-os azonos-  
20 ságot mutatott.

### 25 3. példa

#### *Pseudomonas maltophilia* DI-6-törzsből származó dicamba O-demetiláz többi komponensének tisztítása és jellemzése

**Baktériumtenyészetek és tiszta sejtlizátumok előállítása.** *Pseudomonas maltophilia* DI-6-törzset beoltottunk hat, egyenként kétliteres Erlenmeyer-lombikba, amelyek egy liter, szénforrásként 2,0 mg/ml glükózzal és 2,0 mg/ml „Casamino”-aminosavakkal kiegészített, csökkentett  
30 klorid-tartalmú tápközeget tartalmaztak (Kreuger, J.P.P., Ph.D. thesis, 1989, Illinois Institute of Technology, Chicago). A tenyészeteket orbitális rázógépen (225 rpm, 30°C-on) inkubáltuk. Amikor a tenyészet A<sub>600</sub>-értéke 1,5 és 2,0 között volt, a sejteket elkülönítettük centrifugálással,

Beckman Avanti J-25I centrifugában, JLA-10.500 rotor alkalmazásával, 4000 g-n, 20 percig. A leülepedett sejteket -80°C-on tároltuk. A fagyasztott sejteket felfuszpendáltuk 40 ml, 100 mM MgCl<sub>2</sub>-ban, újra lecentrifugáltuk a fentebb leírtakkal azonos körülmények között, és azután felfuszpendáltuk feltárási pufferben (100 mM 3-[N-morfolino]-propánszulfonsav [MOPS], pH 7,2, 1 mM ditiotritol, 5% glicerint), 2 ml feltárási puffert adtunk 1 gramm nedves sejthez. Hozzáadtunk 80 µl lizozimot 1 gramm sejthez, baktérium-extraktumokban alkalmazható proteáz-inhibitorokkal együtt (Sigma P8465), amelyből 5 ml-t adtunk 20 gramm nedves sejthez. Végül hozzáadtunk fenil-metil-szulfonil-fluoridot (100% etanolban oldott, 0,1 M törzsoldatból) 200 µl-t 50 ml feltárási pufferbe. A sejteket ultrahangos feltárási (Sonic and Materials Inc., Model VCX 600) roncsoltuk szét, 9,0 másodperces kezelésekkkel, közben 3,0 másodperces nyugalmi időszakokkal, összesen 30 percig, 50%-os amplitúdónál. A lizált sejteket lecentrifugáltuk 75 percig, 56.000 g-n, JA-25.50 rotorban, Beckman Avanti J-25I centrifugában, 4°C-on. A felülúszót (tisztá sejt-lizátumot) dekantáltuk, és hozzáadtunk glicerint 15% végkoncentrációban -80°C-on való tároláshoz.

**Dicamba O-demetiláz komponenseinek kezdeti tisztítása.** Körülbelül 2,7 gramm fehérjét tartalmazó, tisztá sejt-lizátumot felvittünk Pharmacia XK 26/60-oszlopra, amely 25 ml DEAE-Sepharose Fast Flow töltetét tartalmazott, amely 1 mM ditiotritolt és 15 térf. glicerint tartalmazó, 50 ml MOPS (pH 7,2) pufferrel (A-puffer) volt ekvilibálva. Az oszlopot „BioCAD” perfúziós kromatográfiás munkaállomáshoz (USDA NRICGP Grant #9504266) csatlakoztattuk, és 5,0 ml/perc áramlási sebességet alkalmaztunk. Miután az anyagot felvittük az oszlopra, A-pufferrel mostuk, amíg a 280 nm-en leolvasott abszorbancia 0,1 alá csökkent. Dicamba O-demetiláz mindhárom komponense kötődött a DEAE-oszlophoz ilyen körülmények között. Az oszlopot 0-500 mM NaCl-gradienssel mostuk, A-pufferben. Ennek eredményeként a ferredoxin 400 mM NaCl-nál eluálódott, és 250 mM NaCl-nél együtt eluálódott a reduktáz és az oxigenáz-komponens.

**Ferredoxin<sub>DIC</sub> tisztítása.** A DEAE-Sepharose oszlopról eluált, ferredoxin<sub>DIC</sub>-tartalmú frakciókat egyesítettük, és kicseréltük a puffert 5 térf.% glicerint és 200 mM NaCl-t tartalmazó 50 mM MOPS-ra (pH 7,2) (B-pufferre). Azután betöményítettük körülbelül 2 ml-re Amicon töményítő-cellában, YM10-membrán alkalmazásával, és Centricon10 töményítőben. A mintát azután felvittük előtöltött Pharmacia HiPrep 26/60 Sephacryl S-100 oszlopra, amelyet előzőleg B-pufferrel ekvilibáltunk, és 0,5 ml/perc áramlási sebességet alkalmaztunk Pharmacia FPLC-berendezésben. Az aktivitást tartalmazó frakciókat egyesítettük, és kicseréltük a puffert 1 mM

ditiotreitol és 5 térf.% glicerint tartalmazó 50 mM MOPS-pufferre (pH 7,2) (C-pufferre). A frakciókat betöményítettük körülbelül 2 ml-re, és azután felvittük Pharmacia Mono Q HR 5/5-oszlopra, melyet C-pufferrel ekvibráltunk. Az oszlopon 0-2,0 M lineáris NaCl-gradiens-elúciót alkalmaztunk C-pufferben. Ferredoxin-aktivitást tartalmazó frakciókat fehérjetartalomra vizsgáltuk és -80°C-on tároltuk.

**Reduktáz<sub>DIC</sub> tisztítása.** A DEAE-Sepharose oszlopról az első tisztítási lépésben eluált, oxigenáz/reduktáz-komponenseket tartalmazó frakciókat egyesítettük, és hozzáadtunk ammónium-szulfátot 1,5 M végkoncentrációban. 4°C-on inkubáltuk 1,5 óra hosszáig, és a mintákat 75 percig centrifugáltuk 56.000 g-n, 4°C-on, JA-25.50 rotorban, Beckman Avanti J-25I centrifugában. A felülúszóval dolgoztunk tovább, és felvittük 25 ml Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow töltetet tartalmazó Pharmacia XK 26/20-oszlopra 5,0 ml/perc áramlási sebesség alkalmazásával, az oszlopot előzőleg 1,5 M ammónium-szulfátot tartalmazó A-pufferrel ekvibráltuk. A reduktáz-komponenst tartalmazó frakciókat egyesítettük, és a puffert kicseréltük B-pufferre, és betöményítettük körülbelül 2 ml-re Amicon töményítő-cellában, YM10-membrán alkalmazásával, és Centricon10 töményítőben. A 2 ml mintát felvittük előtöltött Pharmacia HiPrep 26/60 Sephacryl S-100 oszlopra, amelyet előzőleg B-pufferrel ekvibráltunk, és 0,5 ml/perc áramlási sebességet alkalmaztunk. A reduktáz-aktivitást tartalmazó frakciókat egyesítettük, és a puffert kicseréltük C-pufferre, és betöményítettük körülbelül 2 ml-re. A 2 ml mintát felvittük előtöltött Pharmacia Mono Q HR 5/5-oszlopra, melyet C-pufferrel ekvibráltunk. Az oszlopon 0-2,0 M lineáris NaCl-gradiens-elúciót alkalmaztunk C-pufferben, 0,5 ml/perc áramlási sebességgel. A reduktáz-aktivitást tartalmazó frakciókat fehérjetartalomra vizsgáltuk és -80°C-on tároltuk.

**Gyors enzimvizsgálóti eljárás.** A három komponens aktivitását külön-külön követtük olyan reakciókban, amelyben <sup>14</sup>C-jelölt dicambát alkalmaztunk olyan reakciókeverékben, ahol a további két komponenes feleslegben volt. Az egyes reakciókban a puffer-oldat az alábbiakat tartalmazta: 24 mM kálium-foszfát-puffer (KPi) (pH 7,0), 0,48 mM NADH, 0,48 mM FeSO<sub>4</sub> és 9,6 mM MgCl<sub>2</sub>, amelyből 200 µl fehérje-mintához adagoltunk 30 µl „master” dicamba-keverékkel együtt (a „master” keverék összetétele: 562,4 µl steril víz, 12,0 µl 50 mM dicamba és 25,6 µl <sup>14</sup>C-dicamba-törzsoldat [1,28 µCi]) 311 µl össztérfogatban, ahol a <sup>14</sup>C-dicamba specifikus aktivitása 4,12 µCi/ml volt. 60 perc múlva, a reakciókat 50 µl, 5 térf.% kénsav és 500 µl éter hozzáadásával állítottuk le. A reakciócsöveket vortexen megkevertettük, és mikrocentrifugában (Eppendorf, 5415C modell) 14.000 x g-n, 2 percig centrifugáltuk. Az enzimaktivitás gyors vizuális becsléséhez az egyes reakciócsöveket kézi UV-lámpa (Fotodyne

Inc., 3-6000 modell) alá helyeztük a DCSA reakciótermék fluoreszcenciájának detektálása céljából. Az enzimaktivitás pontosabb, félkvantitatív méréseihez, a reakciótermékeket vékonyréteg-kromatográfia alkalmazásával elválasztottuk az 1. példában leírtak szerint.

**Fehérjekoncentráció meghatározásai.** A tisztítási eljárás különböző fázisaiban kapott 5 frakciókban Bradford vizsgálati eljárás alkalmazásával határoztuk meg a fehérje-koncentrációt (standard eljárás; Bio-Rad; lásd 1. példát).

#### 4. példa

##### Ferredoxin<sub>PRC</sub>-et kódoló klón azonosítása és szekvenálása

10 A tisztított ferredoxin-fehérjéből (a tisztítás leírását lásd a 3. példában) kapott N-terminális szekvencia 29 aminosav hosszúságú volt (a fehérjék szekvenálását az „University of Nebraska-Lincoln Protein Core Facility”-ben végeztük, standard Edman-lebontási eljárás alkalmazásával; lásd az 1. példában leírtakat). A szekvenciát összehasonlítottuk a Genbank-adatbázissal, ami azt mutatta, hogy 35% azonosság van 26 aminosavból álló, átfedő szakaszon 15 egy *Pseudomonas* fajból származó terpredoxinnal, amely egy [2Fe-2S]-ferredoxin az adrenodoxin-családban. A szekvencia-információt három degenerált oligonukleotid (két előre-  
menő és egy reverz) tervezésére használtuk fel. A két, 17-tagú előremenő láncindító oligonukleotid a tisztított ferredoxin-fehérjéből nyert, N-terminális aminosav-szekvenciára alapult. A 17-tagú reverz láncindító oligonukleotid hat korábban szekvenált, bakteriális 20 adrenodoxin-típusú ferredoxin C-terminális végéhez közeli, hat aminosavból álló, konzervatív szekvenciára alapult. A láncindító oligonukleotidokat „egymásba illesztett” („nested”) PCR-reakcióban alkalmaztuk egy 191 bp méretű termék amplifikálására *P. maltophilia* össz-DNS-ből. A terméket „pGEM-T Easy” vektorba (Promega, Madison, WI) klónoztuk és szekvenáltuk. A DNS-szekvenálást az „University of Nebraska-Lincoln DNA Sequencing Core 25 Facility”-ben végeztük, standard didezoxi-mediált láncterminációs eljárás alkalmazásával. A klón levezetett aminosav-szekvenciájának analizisével igazoltuk, hogy egyezik a tisztított ferredoxin-fehérjéből korábban kapott, N-terminális és belső aminosav-szekvenciával. Továbbá, a leszámaztatott aminosav-szekvencia 48%-ban azonos volt teljes hosszúságában *Rhodobacter capsulatus*ból származó [2Fe-2S]-ferredoxinnal. A klónozott fragmenst megje- 30 löltük digoxigeninnel (DIG) (Roche Diagnostics), standard PCR-eljárás alkalmazásával (DIG/Genius-rendszer használati utasítása szerint), és Southern-blottal hibridizáltattuk *P. maltophil*iából származó össz-DNS-hez, melyet előzőleg számos számos restrikciós enzimmel emésztettünk. A gént körülvevő restrikciós hasítóhelyek térképét a próbához hibridizálódott

restrikciós fragmensek mérete alapján állítottuk össze. Ez a kezdeti kísérlet azt mutatta, hogy a gént egy XhoI/PstI-fragmens tartalmazta, amely körülbelül 1 kb hosszúságú volt. Azután *P. maltophilus*-ból származó össz-DNS-t XhoI- és PstI-enzimekkel emésztettünk, és a restrikciós fragmenseket gélben elválasztottuk. A 0,5 és 1,5 kb méret közötti fragmenseket kivágtuk a gélből, és a pBluescript II KS+ vektorba (Stratagene, Inc.) ligáltuk, és DH5 $\alpha$ -sejtekbe (Gibco BRL, Inc.) transzformáltuk. A méret szerint frakcionált könyvtárat tartalmazó baktériumkolóniákat DIG-jelölt próbával szkrineltük, és azonosítottunk egy 900 bp méretű XhoI/PstI-fragmenst. Szekvencia-analízissel kimutattuk, hogy ez a klón teljes hosszúságú, 318 bp méretű ferredoxin-gént (4. azonosítószámú szekvencia) tartalmazott, amely 105 aminosavból álló, 11,4 kDa méretű fehérjét (5. azonosítószámú szekvencia) kódolt. A klónozott génből levezetett aminosav-szekvencia egyezett a tisztított ferredoxin-fehérjéből korábban kapott, N-terminális és belső aminosav-szekvenciával. Továbbá, a levezetett aminosav-szekvencia teljes hosszúságában homológ volt a bakteriális [2Fe-2S]-ferredoxinok adrenodoxin-családjának többi tagjával, 42%-os azonosságot találtunk *Rhodobacter capsulatus*-ból származó ferredoxinnal és 35%-os azonosságot találtunk *Pseudomonas*-ból származó ferredoxinnal (lásd 2. ábrát). A többi három ferredoxin *Caulobacter crescentus*-ból, *Rhodococcus erythropolis*-ból és *Pseudomonas putida*-ból származott. Ehhez a családhoz tartozó fehérjék egyetlen 2Fe-2S vas-kén-klasztert kötnek és három konzervatív motívummal rendelkeznek. Az 1. motívum három konzervatív ciszteint tartalmaz, amelyek 2Fe-2S-ligandumok. A 2. motívum negatívan töltött aminosavakból álló klasztert tartalmaz. A 3. motívum tartalmazza a 2Fe-2S-klaszterben lévő, negyedik konzervatív ciszteint.

## 5. példa

### Reduktáz<sub>DIC</sub>-et kódoló klón azonosítása és szekvenálása

Két reduktáz-gént klónoztunk a 4. példában leírt megközelítés alkalmazásával, a ferredoxin-gén klónozása céljából. A tisztított reduktáz-fehérjéből (a tisztítás leírását lásd a 3. példában) kapott N-terminális szekvencia 25 aminosav hosszúságú volt. A szekvenciát összehasonlítottuk a Genbank-adatbázissal, ami azt mutatta, hogy 90% azonosság van 20 aminosavból álló, átfedő szakaszon dioxin dioxigenáz (*Sphingomonas* sp. RW1-ből korábban izolált háromkomponensű enzim) citokróm P450-típusú reduktáz-komponensével. A tisztított fehérje tripszines emésztésével 10 aminosavból álló, belső szekvenciához jutottunk. A belső szekvencia 87,5%-ban azonos volt *Sphingomonas* sp. RW1-ből származó, ugyanilyen citokróm P450-típusú reduktáz 62-69. aminosavaival. Ezt a szekvencia-információt három degenerált

oligonukleotid (két előremenő és egy reverz) tervezésére használtuk fel. A két, 17-tagú előremenő láncindító oligonukleotid az N-terminális aminosav-szekvenciára alapult, és a 17-tagú reverz láncindító oligonukleotid a belső aminosav-szekvenciára alapult. A láncindító oligonukleotidokat „egymásba illesztett” („nested”) PCR-reakcióban alkalmaztuk egy 180 bp méretű termék amplifikálására *P. maltophilia* össz-DNS-ből. A terméket „pGEM-T Easy” vektorba klónoztuk és szekvenáltuk. A klón levezetett aminosav-szekvenciájának analizisével igazoltuk, hogy egyezik a tisztított reduktáz-fehérjéből korábban kapott, N-terminális és belső aminosav-szekvenciával. Továbbá, a leszármaztatott aminosav-szekvencia 80%-ban azonos volt teljes hosszúságában *Sphingomonas* sp. RW1-törzsből származó dioxin dioxigenáz citokróm P-450-típusú reduktáz komponensével.

A klónozott fragmenst megjelöltük digoxigeninnel (DIG), és Southern-blottal hibridizáltattuk *P. maltophiliaból* származó össz-DNS-hez, melyet előzőleg számos számos restrikciós enzimmel emésztettünk. A Southern-blot azt mutatta, hogy a DIG-jelölt próba két különböző lókuszt ismert fel *P. maltophiliaból* származó össz-DNS különböző restrikciós emésztési termékekben. A megfigyelés alapján feltételezzük, hogy két reduktáz-gén van *P. maltophilia* genomjának különböző helyzeteiben. Lehetséges, hogy a két gén azonos és duplán fordul elő, amely két azonos reduktáz-fehérjét kódol. Alternatív módon, az egyik gén rövidebb fehérjét kódol, amelynek nincs aktivitása, vagy teljes hosszúságú fehérjét kódol, amelynek alacsony aktivitása van az általunk alkalmazott O-demetiláz vizsgálati eljárásban. Mivel olyan gén klónozása szükséges, amely optimális aktivitással rendelkezik, a DIG-jelölt próbát alkalmaztuk mindkét reduktáz-gén azonosítására.

Ha *P. maltophiliaból* származó össz-DNS-t KpnI- és EcoRI-enzimekkel emésztettünk, a DIG-jelölt próba egy restrikciós fragmenshez hibridizálódott, amely körülbelül 4,0 kb hosszúságú volt, és egy másik, nagyobb fragmenshez, amely körülbelül 20 kb méretű volt. A 4,0 kb méretű KpnI/EcoRI-fragmensben lévő gént körülvé, számos restrikciós hasítóhely térképét a próbához hibridizálódott restrikciós fragmensek mérete alapján állítottuk össze. A restrikciós térkép azt mutatta, hogy a teljes gént ennek a 4,0 kb méretű fragmensnek kell tartalmaznia. Ezt követően *P. maltophiliaból* származó össz-DNS-t KpnI- és EcoRI-enzimekkel emésztettünk, és a restrikciós fragmenseket gélben elválasztottuk. A 3,0 és 5,0 kb hosszúság közötti fragmenseket kivágtuk a gélből, és a pBluescript II KS+ vektorba ligáltuk, és DH5 $\alpha$ -sejtekbe transzformáltuk. A méret szerint frakcionált könyvtárat tartalmazó baktériumkolóniákat DIG-jelölt próbával szkrineltük, és azonosítottunk egy 4,3 kb méretű KpnI/EcoRI-fragmenst. Szekvencia-analizissel kimutattuk, hogy ez a klón teljes hosszúságú, 1224 bp mé-

retű reduktáz-gént (6. azonosítószámú szekvencia) tartalmazott, és 408 aminosavból álló, 43,7 kDa méretű fehérjét (7. azonosítószámú szekvencia) kódolt. A klónozott génből levezetett aminosav-szekvencia egyezett a tisztított reduktáz-fehérjéből korábban kapott, N-terminális és belső aminosav-szekvenciával. Továbbá, a levezetett aminosav-szekvencia teljes hosszúságában homológ volt legalább négy másik, FAD-függő piridin-nukleotid reduktázzal, 69%-os azonosságot találtunk *Sphingomonas* sp. RW1-törzsből származó, dioxin dioxigenáz citokróm P450-típusú reduktáz-komponensével, és 36% azonosságot találtunk *Pseudomonas* fajból származó terpredoxin reduktázzal (lásd 3. ábrát). A másik két FAD-függő piridin-nukleotid reduktáz *R. erythropolis*ből és *P. putida*ból származott. FAD-függő piridin-nukleotid reduktázok családjához tartozó fehérjék öt konzervatív motívummal rendelkeznek. Az 1. és 3. motívum három konzervatív glicint tartalmaz, és megfelel az ADP-kötőhelynek FAD-ra és NAD(P)-re, sorrendben. Az 5. motívum megfelel a FAD-flavin-csoport kötőhelyének.

A második gén klónozása céljából, *P. maltophilaból* származó össz-DNS-t KpnI- és EcoRI-enzimekkel emésztettünk, és az eredményül kapott restrikciós fragmenseket agarózgélben elválasztottuk. Körülbelül 20 kb méretű fragmenseket kivágtuk a gélből, és számos restrikciós enzimmal emésztettük, és azután Southern-blottal a DIG-jelölt próbához hibridizáltattuk. A második gént körülvevő restrikciós hasítóhelyek térképét a próbához hibridizálódott restrikciós fragmensek mérete alapján állítottuk össze. Ezek a kísérletek azt mutatták, hogy a teljes hosszúságú gént egy ApaI-fragmensnek kell tartalmaznia, amely körülbelül 3,0 kb hosszúságú. Ezt követően *P. maltophilaból* származó össz-DNS-t ApaI-enzimmal emésztettünk, és a restrikciós fragmenseket gélben elválasztottuk. A 2,0 és 4,0 kb hosszúság közötti fragmenseket kivágtuk a gélből, és a pBluescript II KS+ vektorba ligáltuk, és DH5 $\alpha$ -sejtekbe transzformáltuk. A méret szerint frakcionált könyvtárat tartalmazó baktériumkolóniákat DIG-jelölt próbával szkríneltük, és azonosítottunk egy 3,0 kb méretű ApaI-fragmenst. Szekvenciaanalízissel kimutattuk, hogy ez a 3,0 kb méretű klón teljes hosszúságú, 1227 bp méretű nyitott leolvasási fázist (8. azonosítószámú szekvencia) tartalmazott, és 409 aminosavból álló, 43,9 kDa méretű fehérjét (9. azonosítószámú szekvencia) kódolt. A második reduktáz-gén által kódolt aminosav-szekvencia majdnem azonos volt (98,8%-os azonosság) az első gén szekvenciájával.

## 6. példa

### Növények transzformálása

Abból a célból, hogy a dicamba O-demetiláz három komponensét egyenként olyan kazettákba helyezzük, amelyek alkalmasak növényi expresszióra, az alábbi lépéseket végeztük.

- 5 Lánccindító oligonukleotidokat terveztünk mindhárom gén 5'-végén lévő NcoI-hasítóhely és 3'-végén lévő XbaI-hasítóhely létrehozása céljából, PCR-amplifikációval. Az eredményül kapott PCR-termékeket szekvenálással validáltuk, és azután az egyes géneket egyenként klónoztuk pRTL2-vektorba (Dr. Tom Clemente biztosította, Plant Transformation Core Research Facility, University of Nebraska, Lincoln, Nebraska). Ez a vektor dohányban „marást” okozó
- 10 vírusból („*tobacco etch virus*”; TEV) származó, 144 bp méretű transzlációs enhanszer-szekvenciát [Carrington és Freed, J. Virology **64**, 1590-1597 (1990)] tartalmaz a polilinker 5'-végénél. Az oxigenáz-, reduktáz- és ferredoxin-géneket azután egyenként klónoztuk XhoI/XbaI-fragmentsként pKLP36-jelű növényi expressziós vektorba (Indu Maiti biztosította, University of Kentucky, Lexington, Kentucky) [Maiti és Shepard, Biochem. Biophys. Res.
- 15 Commun. **244**, 440-444 (1998)]. Ez a bináris vektor földi mogyoróban előforduló, klorózt okozó vírusból származó teljes hosszúságú promótert (PCISV FLt36) tartalmaz dupla enhanszer-doménnel konstitutív expresszió céljából növényekben, és borsóból származó rbcS 3'-végi szekvenciát a transzkripció hatékony terminációjához [Maiti és Shepard, Biochem. Biophys. Res. Commun. **244**, 440-444 (1998)]. Egy bináris vektorban mindhárom gént tartal-
- 20 mazó konstrukciókat lehet előállítani a három gén számos, különböző sorrendben és orientációban való kombinációjának alkalmazásával.

- Az alábbi módszereket alkalmaztuk oxigenáz-, ferredoxin- és reduktáz-konstrukciók *Agrobacterium tumefaciens*-be való bevitelére egyenként, és az egyes konstrukciók *Arabidopsis*-ba és dohányba való transzformálására. A három konstrukciót *A. tumefaciens*
- 25 C58C1-törzsbe vittük módosított háromszülős keresztezési eljárással, melyet rutinszerűen alkalmaznak a “Plant Transformation Core Research Facility”-ben. Eszerint az egyes konstrukciókat tartalmazó, *Escherichia coli* sejteket *A. tumefaciens* sejtek és *E. coli* sejtek keverékével inkubáltuk, amelyek pRK2013-jelű helper plazmidot tartalmaztak (plazmid-mobilizáláshoz). Azután az egyes konstrukciókat tartalmazó *A. tumefaciens* sejteket alkalmaztuk dohány és
  - 30 *Arabidopsis* transzformálására a “Plant Transformation Core Research Facility” segítségével. Dohány esetén, levél-explantátumokat inkubáltunk az egyes konstrukciókat tartalmazó, *A. tumefaciens* sejtek szuszpenziójával, és a sarjakat kanamicint tartalmazó, szilárd táptalajon regeneráltuk [Horsch és mtsai, Science **227**, 1229-1231 (1985)]. A dohány transzformációs eljá-

rását részletesen az alábbiakban ismertetjük.

Dohány-explantátumok előállítása

Körülbelül 7,5-10 cm-es leveleket válogattunk 1 hónapos növényekről (a csúcson két levél). Ez 30-40 explantátumhoz volt elegendő. A leveleket nagy főzőpohárba helyeztük, és dH<sub>2</sub>O-val fedtük 20-30 percig. A vizet leöntöttük, és a leveleket 10% Chlorox<sup>TM</sup>-el plusz Tween 20<sup>TM</sup>-al fedtük (1 csepp 50 ml-re). A leveleket 15 percig hagytuk áztatni, és 3X-5X mostuk steril dH<sub>2</sub>O-val. A levéllemez külső szélét, a csúccsal és a levélnyéllel (petiolus) levágtuk, a középső erezetet kivágtuk, és a maradék szövetet 0,5 x 0,5 cm méretű darabokra vágtuk. Az explantátumokat előtenyésztettük, tálcánként 30-at, adaxiális oldalukkal felfelé, 1 napig a beoltás előtt.

Agrobacterium-oltóanyag előállítása:

2 ml *Agrobacterium*-tenyészetet indítottunk megfelelő antibiotikumokkal kiegészített, YEP-tápközegben (10 g/l pepton, 10 g/l NaCl és 5 g/l élesztőkivonat, pH 7,0). Hagytuk, hogy a sejtsűrűség elérje a maximumot. A 2 ml tenyészetet szubkultúrába vittük 50 ml YEP-tápközegben, és hagytuk növekedni 6-8 óra hosszáig (28°C-on, állandó rázatás közben). A sejteket centrifugálással elkülönítettük (3000-400 rpm). A baktérium-üledékeket felfüggesztettük OD<sub>600</sub>=0,3-1,0-re, együtt-tenyésztési tápközegben.

Az előállított *Agrobacterium*-inokulumot átvittük Petri-csészékbe. Az előtenyésztett explantátumokat 30 percig inokuláltuk. Az explantátumokat steril szűrőpapírra blottoltuk, és 0,8% agarral szilárdított együtt-tenyésztési tápközegbe helyeztük (10 explantátum csészénként), amelyet befedtünk steril szűrőpapírral (együtt tenyésztett növények az adaxiális oldalukkal felfelé). Az explantátumokat 3 napig tenyésztettük együtt. Az együtt-tenyésztési időszak után az explantátumokat rövid ideig mostuk regenerációs tápközegben.

A mosott explantátumokat steril szűrőpapírra blottoltuk, és szövetet (10 explantátum csészénként) átvittük 0,8% agarral szilárdított regenerációs tápközegbe, amely még szelekciós ágenszt (150 mg/l kanamicint) tartalmazott. Az explantátumokat adaxiális oldalukkal felfelé tenyésztettük. A szövetet kéthetente átvittük friss regenerációs tápközegbe, és a sarjakat kivágtuk (> 3 cm), és szubkultúrába vittük gyökereztető tápközegbe. A gyökeres sarjakat azután talajba telepítettük.

Reagensok:

Előtenyésztési tápközeg (PM):

MS-sók B5-vitaminokkal, 3% szacharóz kiegészítve 1 mg/l BAP-al, 1 mg/l NAA-val és 8 µg/l pCPA-val (p-klór-fenoxi-ecetsavval), pH 5,7. (Megjegyzés: minden növekedési sza-

bályzót sterilre szűrünk).

Együtt-tenyésztési tápközeg (CM):

1/10 MS/B5-tápközeg, 3% szacharózzal, 1,0 mg/l BAP-al, 0,1 mg/l NAA-val és 8 µg/l pCPA-val kiegészítve.

5 Regenerációs tápközeg (RM):

MS/B5-tápközeg, 1,0 mg/l BAP-al, 0,1 mg/l NAA-val és 3% szacharózzal kiegészítve, pH 5,7. Carbenicillin (500 mg/l) és cefotaxime (100 mg/l) antibiotikumokat alkalmazunk.

Gyökereztetési tápközeg:

10 MS-sók teljes erősségű B5-vitaminokkal, kiegészítve 0,1 mg/l NAA-val és 1% szacharózzal. A tápközeget 0,8% agar szilárdítja. Az antibiotikumok koncentrációja (ha 75 mg/l „npt II”-t alkalmazunk): 500 mg/l carbenicillin és 100 mg/l cefotaxime.

Kiválasztottunk tíz-tíz sarjat mindhárom transzformációs kísérletből, gyökereztető tápközegbe helyeztük néhány hétre, és azután cserepekbe ültettük üvegházban. *Arabidopsis* esetén egy cserép virágzó növényt inkubáltunk *A. tumefaciens* sejtek szuszpenziójával, amelyek az egyes konstrukciókat tartalmazták, és azután a növényeket hagytuk felmagzani [Bechtold és Mitsui, C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life sciences 316, 1194-1199 (1993); Clough és Bent, Plant J. 16, 735-743 (1998)]. Magokat fogtunk, és csíráztattuk azokat kanamicint tartalmazó tápközegben. Miután a csíranövények kielégítő mértékben gyökérrendszert fejlesztettek, néhány növényt kiválasztottunk az egyes transzformációs kísérletekből, és átültettük 20 cserépbe tenyésztő kamrában.

A transzformált növényekben, az egyes gének expressziójának kiértékeléséhez néhány transzformált növényből származó levelek lizátumát felvittük Western-blotra, és próbaként olyan poliklonális ellenanyagokat alkalmaztunk, amelyek a dicamba O-demetiláz három komponensét detektálták. Az egyes enzimek növényi extraktumokban való aktivitásának meghatározása céljából olyan megközelítést alkalmaztunk, amelyben az oxigenáz-, ferredoxin- vagy 25 reduktáz-fehérjéket expresszáló, transzformált növényekből származó levelek lizátumait kombináltuk feleslegben lévő, *P. maltophilia* DI-6-törzsből tisztított, O-demetiláz további komponenseivel. Ezt a keveréket teszteltük dicamba O-demetiláz-aktivításra standard <sup>14</sup>C-jelölt dicamba vizsgálati eljárással (lásd az 1. és 3. példában leírtakat) és HPLC vizsgálati eljárásban, 30 amelyben nem-radioaktív dicamba-t alkalmaztunk szubsztrátként (dicamba és 3,6-DCSA különböző pontokban eluálódik a HPLC-ről és mérni lehet).

A géntermékek kloroplasztisban való expressziójának tesztelése céljából olyan konstrukciókat állítottunk elő, amelyekben az oxigenáz, ferredoxin és reduktáz 5'-végénél egy

transzitpeptid-szekvencia volt. Ilyen megközelítést sikeresen alkalmaztak szulfonil-karbamid-herbicidtolerancia dohánynövényekbe való bevitelére [O'Keefe és mtsai., Plant Physiol. 105, 473-478 (1994)]. Konkrétabban borsóból származó, ribulóz-1,5-bifoszfát karboxiláz kis alegységének transzitpeptid-(szignál)szekvenciáját (19. azonosítószámú nukleinsav-szekvencia) géntechnológiailag bevittük oxigenáz-, ferredoxin- vagy reduktáz-gént tartalmazó, intermedier pRTL2-vektorba, amelyben mindegyik saját expressziós szabályzó szekvenciáját tartalmazta (lásd fentebb). Ezt úgy végeztük, hogy a transzitpeptid mindkét végén létrehoztunk NcoI-hasítóhelyeket, láncindító oligonukleotidokkal és PCR-eljárással. Az NcoI-hasítóhely elsegíti a transzitpeptid bevitelét a TEV-vezetőszekvencia és a riportergén (oxigenáz, reduktáz vagy ferredoxin) közé az pRTL2-vektorban. Azután az egész kazettát (TEV-vezetőszekvencia, transzitpeptid és riportergén) kivágtuk a pRTL2-vektorból XhoI/XbaI-fragmentsként, és bevittük PC1SVFL36-promótert és rbcS 3'-terminátort tartalmazó, pKLP36-jelű bináris vektorba.

Úgy teszteltük annak a valószínűségét, hogy a bakteriális ferredoxin-gén kódonhasználata nem volt teljesen optimális növényi sejtekben hatékony transzlációra, hogy ugyanolyan aminosav-szekvenciát kódoló, szintetikus ferredoxin-gént szintetizáltunk, mint a *P. maltophilia* DI-6-törzsből származó ferredoxin aminosav-szekvenciája, de kétszikű növényekre optimalizált kódon-eltérésekkel, a szintézist az Entelechon, GmbH cégnél végezték (Regensburg, Németország). Jól dokumentált, hogy a kódonhasználatban történt változtatások esszenciálisak bakteriális *B.t.* toxin-gének optimális expressziójához növényi sejtekben [lásd például Diehn és mtsai., Genetic Engineering 18, 83-99 (1996)].

## 7. példa

### Növények permetezése

Transzgenikus dohány-növények dicamba-rezisztenciájának tesztelése céljából, a 6. példában, fentebb leírt T<sub>0</sub>-generációból származó magokat csíráztattunk, és 10-12-leveles állapotig növesztettük. A „Department of Agronomy” segítségével ezeket a növényeket egyenletesen („állandó folyadékszállítási sebességgel”) permeteztük [Burnside, Weed Science 17, 102-104 (1969)], elterjedten alkalmazott permetező-berendezés alkalmazásával, amely az ISCO cég gyártmánya volt. A permetező TEEJET szórófejjel és ernyővel rendelkezett, körülbelül 3,0 km/óra szállítási sebességet és 42 psi nyomást alkalmaztunk. A szórófej körülbelül 20,3 cm-re volt a növények levelei fölött. Dicamba-t (kereskedelmi forgalomban lévő termék: Clarity) különböző koncentrációban permeteztünk a növényekre nem-ionos felületaktív anyaggal keverve, 0,41 hektáronként (1 acre) körülbelül 90,86 liter mennyiségben, nagynyomású levegő alkalma-

zásával.

Az eredeti növénypusztítás mértékét leíró görbe felvétele céljából, vad típusú dohány-növényeket kezeltünk növekvő koncentrációjú dicamba-val 0 és 0,55 kg/hektár (azaz 0,5 lbs/acre) közötti tartományban. Megállapítottuk, hogy a vad típusú növények 100%-ban érzé-  
 5 kenyek voltak 0,55 kg/hektár mennyiségű dicambára, majd az oxigenáz-gént egymagában vagy tranzitpeptiddel tartalmazó, transzgenikus növényeket kezeltünk növekvő koncentrációjú dicamba-val, 0,55 kg/hektár és 5,5 kg/hektár közötti mennyiségben. Az oxigenáz-génkonstrukciót tartalmazó, de tranzitpeptidet kódoló szekvenciát nem tartalmazó, transzgenikus növények rezisztensek voltak dicamba-ra (azaz növekedtek és egészségesek voltak) legalább 2,75  
 10 kg/hektár mennyiségű dicamba-kezelésre. Az oxigenáz-génkonstrukciót tranzitpeptiddel tartalmazó, transzgenikus dohánynövények növekedtek és egészségesek voltak még akkor is, ha 5,5 kg/hektár mennyiségű dicamba-val permeteztük azokat. Tehát, az oxigenáz-gént tranzitpeptidet kódoló szekvenciával vagy anélkül tartalmazó, transzgenikus növények megjelenése hasonló volt a kezeletlen kontroll növényekéhez abban az esetben, ha maximum a jelzett  
 15 mennyiségű dicamba-val kezeltük azokat, míg ugyanekkora mennyiségű dicamba-val kezelt, nem-transzgenikus növények csökkent mértékben növekedtek, elhervadtak és súlyos nekrozist mutattak.

Egy hasonló kísérletben a három génkonstrukciót (oxigenáz-, ferredoxin- és reduktáz-géneket) tartalmazó, transzgenikus növényeket permeteztünk 0,138 kg/hektár dicambával. A  
 20 három génkonstrukciót tartalmazó, transzgenikus növények növekedtek és egészségesek voltak, ha ilyen dicamba-koncentráció alkalmazásával permeteztük azokat, míg ugyanilyen mennyiségű dicamba-val kezelt nem-transzgenikus növények csökkent mértékben növekedtek, elhervadtak és súlyos nekrozist mutattak. Mivel az oxigenáz-konstrukciót tartalmazó növények toleránsak voltak dicamba-ra 2,75 kg/hektár dicamba alkalmazása esetén is, előre látható, hogy  
 25 a három génkonstrukciót tartalmazó transzgenikus növények hasonlóan rezisztensek 2,75 kg/hektár, sőt még több dicamba alkalmazása esetén is.

Ezek az eredmények egyértelműen alátámasztják, hogy a találmány szerinti, dicamba-lebontó oxigenázzal vagy a három génkonstrukcióval transzformált, transzgenikus növények szerzett rezisztenciával rendelkeznek dicamba-ra.

**A szekvencialistában található kötetlen szövegek fordításai**

I. szekvencia: 28. pozíció: az Xaa legvalószínűbben: Asp vagy Thr

29. pozíció: az Xaa legvalószínűbben: Pro

## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. DNS-molekula, amely a következő aminosav-szekvenciák bármelyikével rendelkező, dicamba-lebontó ferredoxint kódoló DNS-szekvenciát tartalmaz:

- a) az 5. azonosítószámú szekvenciát (SEQ ID NO: 5) tartalmazó aminosav-szekvencia;
- b) aminosav-szekvencia, amely 5. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 5) enzimatikusan aktív fragmense; és
- c) az 5. azonosítószámú szekvenciával legalább mintegy 85%-ban azonos aminosav-szekvencia, amely dicamba-lebontó ferredoxin-aktivitással rendelkezik.

2. Az 1. igénypont szerinti DNS-molekula, amely 5. azonosítószámú (SEQ ID NO: 5) aminosav-szekvenciájú dicamba-lebontó ferredoxint kódoló DNS-szekvenciát tartalmaz.

3. Az 1. igénypont szerinti DNS-molekula, amely tartalmazza a 4. azonosítószámú nukleinsav-szekvenciát (SEQ ID NO: 4).

4. DNS-molekula, amely a következő aminosav-szekvenciák bármelyikével rendelkező, dicamba-lebontó reduktázt kódoló DNS-szekvenciát tartalmaz:

- a) 7. vagy 9. azonosítószámú szekvenciával (SEQ ID NO: 7 vagy 9) rendelkező aminosav-szekvencia;
- b) aminosav-szekvencia, amely az a) pontban leírt aminosav-szekvencia enzimatikusan aktív fragmense; és
- c) az a) pontban leírt aminosav-szekvenciával legalább mintegy 85%-ban azonos aminosav-szekvencia, amely dicamba-lebontó reduktáz-aktivitással rendelkezik.

5. A 4. igénypont szerinti DNS-molekula, amely 7. azonosítószámú aminosav-szekvenciájú (SEQ ID NO: 7) dicamba-lebontó reduktázt kódoló DNS-szekvenciát tartalmaz.

6. A 4. igénypont szerinti DNS-molekula, amely 9. azonosítószámú aminosav-szekvenciájú (SEQ ID NO: 9) dicamba-lebontó reduktázt kódoló DNS-szekvenciát tartalmaz.

7. A 4. igénypont szerinti DNS-molekula, amely 6. vagy 8. azonosítószámú nukleinsav-szekvenciát (SEQ ID NO: 6 vagy 8) tartalmaz.

8. DNS-konstrukció, amely legalább egy expressziós szabályzó szekvenciákhoz működőképesen kapcsolt, 1-7. igénypontok bármelyike szerinti DNS-molekulát tartalmaz.

9. A 8. igénypont szerinti DNS-konstrukció, amelyben a nukleinsav-szekvencia kétszikű növényekben optimalizált expresszióra kiválasztott kódonokkal rendelkezik.

10. Dicamba-lebontó O-metilázt kódoló DNS-konstrukció, amely expressziós szabályzó szekvenciákhoz működőképesen kapcsolt, a következőket kódoló DNS-szekvenciát tartalmaz:

- a) a következő aminosav-szekvenciák bármelyikét tartalmazó, dicamba-lebontó oxigenázt:
  - i) a 3. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 3);
  - ii) aminosav-szekvencia, amely a 3. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 3) enzimatikusan aktív fragmense; vagy
  - iii) a 3. azonosítószámú szekvenciával (SEQ ID NO: 3) legalább mintegy 85%-ban azonos aminosav-szekvencia, amely dicamba-lebontó oxigenáz-aktivitással rendelkezik; és
  - iv) a 3. azonosítószámú szekvenciától (SEQ ID NO: 3) egy szubsztitúcióban, egy addícióban vagy egy szubsztitúcióban és egy addícióban különböző aminosav-szekvencia;

- b) a következő aminosav-szekvenciák bármelyikét tartalmazó, dicamba-lebontó ferredoxint:
- i) az 5. azonosítószámú szekvenciát tartalmazó aminosav-szekvencia (SEQ ID NO: 5);
  - ii) aminosav-szekvencia, amely az 5. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 5) enzimatikusan aktív fragmense; vagy
  - iii) az 5. azonosítószámú szekvenciával legalább mintegy 85%-ban azonos aminosav-szekvencia, amely dicamba-lebontó ferredoxin-aktivitással rendelkezik; és
- c) a következő aminosav-szekvenciák bármelyikét tartalmazó, dicamba-lebontó reduktázt:
- i) a 7. vagy 9. azonosítószámú szekvenciával (SEQ ID NO: 7 vagy 9) rendelkező aminosav-szekvencia;
  - ii) aminosav-szekvencia, amely az i) pontban leírt aminosav-szekvencia enzimatikusan aktív fragmense; vagy
  - iii) az i) pontban leírt aminosav-szekvenciával legalább mintegy 85%-ban azonos aminosav-szekvencia, amely dicamba-lebontó reduktáz-aktivitással rendelkezik.
11. A 8. igénypont szerinti DNS-konstrukció, amely konstrukció olyan tranzitpeptidet kódoló nukleinsav-szekvenciát is tartalmaz, amely a dicamba-lebontó oxigenázt növényi sejt organelleimaihoz képes célba juttatni.
12. A 11. igénypont szerinti DNS-konstrukció, amelyben a tranzitpeptidet a 19. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 19) kódolja.
13. A 8-12. igénypontok bármelyike szerinti DNS-konstrukció, amely vektor.
14. A 13. igénypont szerinti DNS-konstrukció, ahol a vektor tartalmaz növényi promotert.
15. Transzgenikus gazdasejt, amely 8-13. igénypontok bármelyike szerinti DNS-konstrukciót tartalmaz.
16. A 15. igénypont szerinti transzgenikus gazdasejt, amelyben a DNS-konstrukció a következőket kódoló DNS-szekvenciát tartalmaz: a 3. azonosítószámú aminosav-szekvenciával (SEQ ID NO: 3) rendelkező dicamba-lebontó oxigenázt; az 5. azonosítószámú aminosav-szekvenciával (SEQ ID NO: 5) rendelkező dicamba-lebontó ferredoxint; és a 7. vagy 9. azonosítószámú aminosav-szekvenciával (SEQ ID NO: 7 vagy 9) rendelkező dicamba-lebontó reduktázt.
17. A 15. vagy 16. igénypont szerinti transzgenikus gazdasejt, amely növényi sejt.
18. A 15. vagy 16. igénypont szerinti transzgenikus gazdasejt, amely mikroorganizmus.
19. A 8-14. igénypontok bármelyike szerinti DNS-konstrukció alkalmazása transzgenikus növény előállítására.
20. A 19. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a DNS-konstrukció a következőket kódoló DNS-szekvenciát tartalmaz: a 3. azonosítószámú aminosav-szekvenciával (SEQ ID NO: 3) rendelkező, dicamba-lebontó oxigenázt; az 5. azonosítószámú aminosav-szekvenciával (SEQ ID NO: 5) rendelkező, dicamba-lebontó ferredoxint; és a 7. vagy 9. azonosítószámú aminosav-szekvenciával (SEQ ID NO: 7 vagy 9) rendelkező, dicamba-lebontó reduktázt.
21. Az 19. vagy 20. igénypont szerinti alkalmazás, amely szerint dicambára toleráns, kétszikű vagy egyszikű növényt állítunk elő.
22. Eljárás gyomnövények kiirtására a 19-21. igénypontok bármelyike szerint előállított transzgenikus növényt tartalmazó szántóföldön, *azzal jellemezve*, hogy a szántóföldön található gyomok kiirtásához hatásos mennyiségű dicambát juttatunk a szántóföldre.
23. Eljárás dicambát tartalmazó anyag dekontaminálására, *azzal jellemezve*, hogy 18. igénypont szerinti dicamba-lebontó, transzgenikus mikroorganizmust alkalmazunk az anyagon akkora mennyiségben, amely haté-

kony az anyagban lévő dicamba legalább egy részének lebontására.

**24. Eljárás transzformált növényi sejtek szelektálására, *azzal jellemezve*, hogy**

- i) veszünk egy növényi sejtpopulációt;
- ii) a növényi sejtpopulációban lévő növényi sejtek legalább egy részét transzformáljuk a 8-14. igénypontok bármelyike szerinti DNS-konstrukcióval; és
- iii) az így kapott növényi sejtpopulációt dicambát tartalmazó tenyésztési táptalajon növesztjük, amelyben a dicamba koncentrációját úgy állítjuk be, hogy a 8-14. igénypontok bármelyike szerinti DNS-konstrukcióval transzformált növényi sejtek növekedjenek, a nem-transzformált növényi sejtek pedig ne növekedjenek.

**25. Eljárás transzformált növények szelektálására, *azzal jellemezve*, hogy**

- i) veszünk egy olyan növényi populációt, melynek feltehetően van olyan tagja, amely a 8-14. igénypontok bármelyike szerinti DNS-konstrukcióval letti transzformálva; és
- ii) akkora mennyiségű dicambát alkalmazunk a szelektálni kívánt növényi populáción, amelynek jelenlétében a 8-14. igénypontok bármelyike szerinti DNS-konstrukcióval transzformált növények növekednek, a nem-transzformált növények növekedése pedig gátolt.

**26. Eljárás transzformált gazdasejtek, intakt növények vagy növényrészek szelektálására vagy szkrínelésére, *azzal jellemezve*, hogy**

- i) olyan gazdasejteket, intakt növényeket vagy növényrészeket tartalmazó populációt veszünk, melynek tagjai feltehetően tartalmaznak 8-13. igénypontok bármelyike szerinti DNS-konstrukcióval transzformált gazdasejteket, intakt növényeket vagy növényrészeket, miáltal azok képesek dicambát lebontani;
- ii) a gazdasejteket, intakt növényeket vagy növényrészeket tartalmazó populációt dicambával érintkeztetjük; és
- iii) meghatározzuk a 3,6-diklór-szalicilsavnak tulajdonítható fluoreszcencia jelenlétét vagy mértékét, amely 3,6-diklór-szalicilsav a transzformált gazdasejtekben, intakt növényekben vagy növényrészekben képződik dicamba lebontásának eredményeként.

**27. Izolált és legalább részlegesen tisztított dicamba-lebontó ferredoxin, amely a következő aminosav-szekvenciák bármelyikét tartalmazza:**

- a) az 5. azonosítószámú szekvenciát (SEQ ID NO: 5) tartalmazó aminosav-szekvencia;
- b) aminosav-szekvencia, amely az 5. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 5) enzimatikusan aktív fragmense; és
- c) az 5. azonosítószámú szekvenciával (SEQ ID NO: 5) legalább mintegy 65%-ban azonos aminosav-szekvencia;

ahol az a), b) és c) pontok szerinti aminosav-szekvenciák mindegyike rendelkezik ferredoxin enzimaktivitással.

**28. A 27. igénypont szerinti dicamba-lebontó ferredoxin, amely 5. azonosítószámú aminosav-szekvenciát (SEQ ID NO: 5) tartalmaz.**

**29. Izolált és legalább részlegesen tisztított, dicamba-lebontó reduktáz, amely az alábbi aminosav-szekvenciák bármelyikét tartalmazza:**

- a) a 7. vagy 9. azonosítószámú szekvenciával (SEQ ID NO: 7 vagy 9) rendelkező aminosav-szekvencia;
- b) aminosav-szekvencia, amely az a) pontban leírt aminosav-szekvencia enzimatikusan aktív fragmense;

vagy

c) az a) pontban leírt aminosav-szekvenciával legalább mintegy 75%-ban azonos aminosav-szekvencia;  
ahol az a), b) és c) pontok szerinti aminosav-szekvenciák mindegyike rendelkezik reduktáz enzimaktivitással.

30. A 28. igénypont szerinti dicamba-lebontó reduktáz, amely tartalmazza a 7. azonosítószámú aminosav-szekvenciát (SEQ ID NO: 7).

31. A 28. igénypont szerinti dicamba-lebontó reduktáz, amely tartalmazza a 9. (SEQ ID NO: 9) azonosítószámú aminosav-szekvenciát.

32. Eljárás dicambát tartalmazó anyag dekontaminálására, *azzal jellemezve*, hogy 27. igénypont szerinti dicamba-lebontó ferredoxint, 29. igénypont szerinti dicamba-lebontó reduktázt vagy 10. igénypont szerinti DNS-konstrukció által kódolt, dicamba-lebontó O-demetilázt alkalmazunk az anyagon az anyagban található dicamba legalább egy részének lebontására hatékony mennyiségben.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Jogi Iroda Kft.



dr. Pethő Árpád

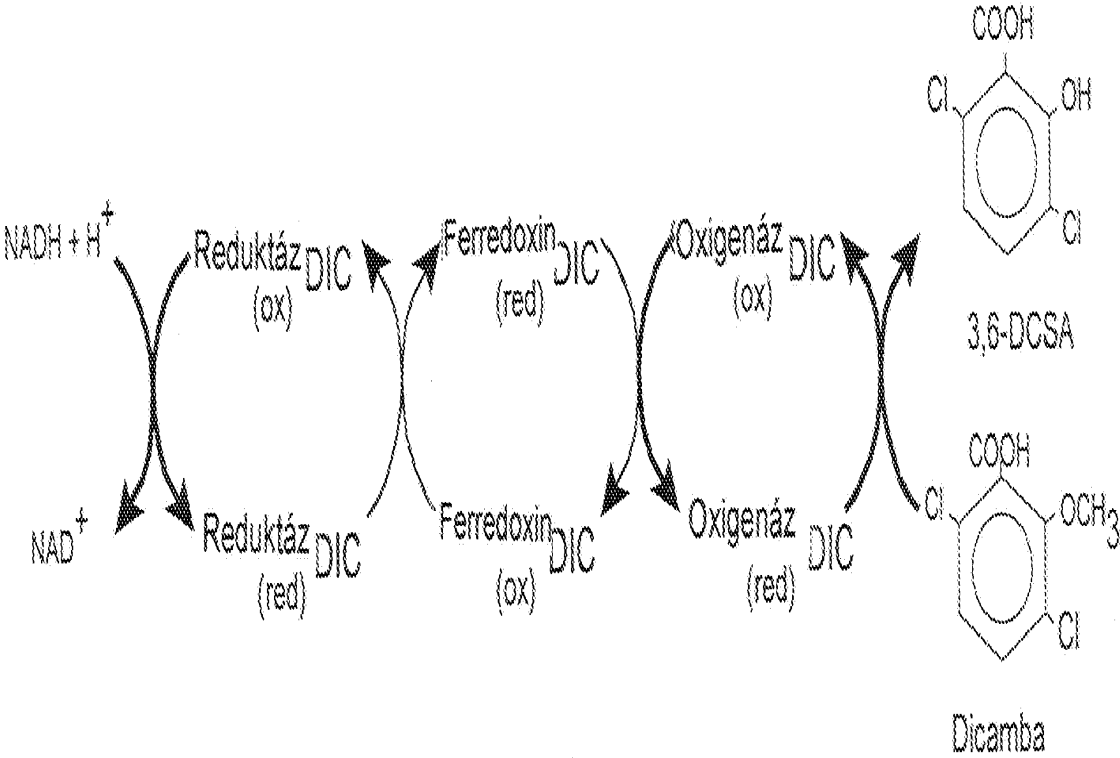
szabadalmi ügyvivő

33 oldal  
3 alra old.  
22 old. művelet  

---

78 oldal

Belet



1. ábra

## 2. ábra

|            |             |             |             |        |    |
|------------|-------------|-------------|-------------|--------|----|
| fer6_rhoa  | -AKIIEIEHN  | GTRHEVEAKP  | GLTVMEAAARD | NGVPCI | 35 |
| fer_caucr  | WAGITTYIQHD | GAQGVVDVKP  | GLTVMEGAUVK | NNVPCI | 35 |
| thcc_rhoer | -PTVTVVRED  | GTRHEVEVPT  | GKRVWQAAIG  | AGDGI  | 35 |
| putx_psepu | -SRVVVVSHD  | GTRREEDVAD  | GVSLMGAAYS  | NGLYDI | 35 |
| terp_pseap | -PRVVVIDEQ  | SGEYAVDAQD  | GQSENEVATO  | NGVPCI | 35 |
| ferr_d16   | MPQITVVNQS  | GEESSEVEASE | GRTLMEVIRD  | SGFDE  | 36 |

1

2

|            |            |            |            |        |    |
|------------|------------|------------|------------|--------|----|
| fer6_rhoa  | DADCGGACAC | STCHAYVDPA | WVDKLEKALP | TETDM  | 71 |
| fer_caucr  | DADCGGACAC | ATCHVYVDEA | WBDKTCGKSA | NEESML | 72 |
| thcc_rhoer | VACCGGQAMC | ATCHVYVDEA | WADKPSISE  | EDDML  | 71 |
| putx_psepu | VQDCGGASAC | ATCHVYVDEA | FTDKVPAANE | REICML | 71 |
| terp_pseap | VACCGGSCVC | ATCHVYVDEA | WVEEVGEAMP | DENDL  | 71 |
| ferr_d16   | DADCGGCSGC | ATCHVYVDEA | EMDKLEEMSE | DENDL  | 72 |

3

|            |             |            |            |           |
|------------|-------------|------------|------------|-----------|
| fer6_rhoa  | DFAYEPPNPT  | SRLSCQIKVT | SLLDGLVVHL | PEKQI106  |
| fer_caucr  | DFAENVEP.N  | SRLSCQIKVS | DALDGLVVRL | PESOH106  |
| thcc_rhoer | DDTVSPRTEA  | SRLSCQIVVS | DDVDGLVRL  | PEEQV106  |
| putx_psepu | ECVTAEELKPN | SRLSCQIIMT | FELDGLVVDV | PERQW106  |
| terp_pseap | QSTGEPMTAG  | SRLSCQIFED | PSMDGLVVRV | PLPA-105  |
| ferr_d16   | DSS.DHRNEY  | SRLSCQIPVT | GALCGKVT   | AGEED-105 |

1

|            |           |          |           |          |            |       |    |
|------------|-----------|----------|-----------|----------|------------|-------|----|
| red1_d16   | --MSADVVY | VGAGHGGG | AIARNGHPE | GEITYGDS | EVYVERPPLS | KEVYF | 53 |
| red2_d16   | --MSADVVY | VGAGHGGG | AIARNGHPE | GEITYGDS | EVYVERPPLS | KEVYF | 53 |
| aj002606   | --MSADVVY | VGAGHGGG | AIARNGHPE | GEITYGDS | EVYVERPPLS | KEVYF | 53 |
| thcd_rhoer | -----SSVY | VGAGHGGG | AIARNGHPE | GEITYGDS | EVYVERPPLS | KEVYF | 49 |
| cama_psepu | KNANONIV  | VGAGHGGG | AIARNGHPE | GEITYGDS | EVYVERPPLS | KEVYF | 54 |
| tera_pseep | KCFRDTTNA | VGAGHGGG | AIARNGHPE | GEITYGDS | EVYVERPPLS | KEVYF | 55 |

2

|            |            |            |           |           |           |       |     |
|------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|-------|-----|
| red1_d16   | REKTFRRLVI | RPPTPAAGKH | ISFEGTSTV | KVDPKAHSL | LSNGESYCG | KLVWA | 108 |
| red2_d16   | REKTFRRLVI | RPPTPAAGKH | ISFEGTSTV | KVDPKAHSL | LSNGESYCG | KLVWA | 108 |
| aj002606   | REKTFRRLVI | RPPTPAAGKH | ISFEGTSTV | KVDPKAHSL | LSNGESYCG | KLVWA | 108 |
| thcd_rhoer | SEKTFRRLVI | RPPTPAAGKH | ISFEGTSTV | KVDPKAHSL | LSNGESYCG | KLVWA | 104 |
| cama_psepu | REKTFRRLVI | RPPTPAAGKH | ISFEGTSTV | KVDPKAHSL | LSNGESYCG | KLVWA | 108 |
| tera_pseep | REKTFRRLVI | RPPTPAAGKH | ISFEGTSTV | KVDPKAHSL | LSNGESYCG | KLVWA | 108 |

2

3

|            |             |            |            |            |           |       |     |
|------------|-------------|------------|------------|------------|-----------|-------|-----|
| red1_d16   | EGGDPFRRLSC | CGG...DLTG | IHAYRTREDC | DTLMAVVOAG | FNIVVIGGG | VIGGG | 160 |
| red2_d16   | EGGDPFRRLSC | CGG...DLTG | IHAYRTREDC | DTLMAVVOAG | FNIVVIGGG | VIGGG | 160 |
| aj002606   | EGGDPFRRLSC | CGG...DLTG | IHAYRTREDC | DTLMAVVOAG | FNIVVIGGG | VIGGG | 160 |
| thcd_rhoer | EGGDPFRRLSC | CGG...DLTG | IHAYRTREDC | DTLMAVVOAG | FNIVVIGGG | VIGGG | 155 |
| cama_psepu | EGGDPFRRLSC | CGG...DLTG | IHAYRTREDC | DTLMAVVOAG | FNIVVIGGG | VIGGG | 163 |
| tera_pseep | EGGDPFRRLSC | CGG...DLTG | IHAYRTREDC | DTLMAVVOAG | FNIVVIGGG | VIGGG | 158 |

3

|            |       |      |      |      |        |    |     |         |     |
|------------|-------|------|------|------|--------|----|-----|---------|-----|
| red1_d16   | AAAVL | ERNG | KVTL | LEAL | VLAVAG | ED | EVY | VERPPLS | 213 |
| red2_d16   | AAAVL | ERNG | KVTL | LEAL | VLAVAG | ED | EVY | VERPPLS | 213 |
| aj002606   | AAAVL | ERNG | KVTL | LEAL | VLAVAG | ED | EVY | VERPPLS | 213 |
| thcd_rhoer | AAAVL | ERNG | KVTL | LEAL | VLAVAG | ED | EVY | VERPPLS | 208 |
| cama_psepu | AAAVL | ERNG | KVTL | LEAL | VLAVAG | ED | EVY | VERPPLS | 218 |
| tera_pseep | AAAVL | ERNG | KVTL | LEAL | VLAVAG | ED | EVY | VERPPLS | 213 |

4

|            |            |            |             |          |           |       |     |
|------------|------------|------------|-------------|----------|-----------|-------|-----|
| red1_d16   | LYOERGAVTS | VOLAGGEVTS | AGGVIVGICHT | VPAVGPFL | CAACAGCVD | DEYCT | 268 |
| red2_d16   | LYOERGAVTS | VOLAGGEVTS | AGGVIVGICHT | VPAVGPFL | CAACAGCVD | DEYCT | 268 |
| aj002606   | LYOERGAVTS | VOLAGGEVTS | AGGVIVGICHT | VPAVGPFL | CAACAGCVD | DEYCT | 267 |
| thcd_rhoer | LYOERGAVTS | VOLAGGEVTS | AGGVIVGICHT | VPAVGPFL | CAACAGCVD | DEYCT | 262 |
| cama_psepu | LYOERGAVTS | VOLAGGEVTS | AGGVIVGICHT | VPAVGPFL | CAACAGCVD | DEYCT | 273 |
| tera_pseep | LYOERGAVTS | VOLAGGEVTS | AGGVIVGICHT | VPAVGPFL | CAACAGCVD | DEYCT | 268 |

5

|            |     |     |     |        |     |     |       |     |      |     |
|------------|-----|-----|-----|--------|-----|-----|-------|-----|------|-----|
| red1_d16   | PSL | PDY | ATG | DCAPAC | DTA | GGN | NVESV | QNA | NDGT | 323 |
| red2_d16   | PSL | PDY | ATG | DCAPAC | DTA | GGN | NVESV | QNA | NDGT | 323 |
| aj002606   | PSL | PDY | ATG | DCAPAC | DTA | GGN | NVESV | QNA | NDGT | 322 |
| thcd_rhoer | PSL | PDY | ATG | DCAPAC | DTA | GGN | NVESV | QNA | NDGT | 317 |
| cama_psepu | PSL | PDY | ATG | DCAPAC | DTA | GGN | NVESV | QNA | NDGT | 327 |
| tera_pseep | PSL | PDY | ATG | DCAPAC | DTA | GGN | NVESV | QNA | NDGT | 323 |

|            |     |     |     |        |     |     |       |     |      |     |
|------------|-----|-----|-----|--------|-----|-----|-------|-----|------|-----|
| red1_d16   | PSL | PDY | ATG | DCAPAC | DTA | GGN | NVESV | QNA | NDGT | 378 |
| red2_d16   | PSL | PDY | ATG | DCAPAC | DTA | GGN | NVESV | QNA | NDGT | 378 |
| aj002606   | PSL | PDY | ATG | DCAPAC | DTA | GGN | NVESV | QNA | NDGT | 377 |
| thcd_rhoer | PSL | PDY | ATG | DCAPAC | DTA | GGN | NVESV | QNA | NDGT | 372 |
| cama_psepu | PSL | PDY | ATG | DCAPAC | DTA | GGN | NVESV | QNA | NDGT | 382 |
| tera_pseep | PSL | PDY | ATG | DCAPAC | DTA | GGN | NVESV | QNA | NDGT | 376 |

|            |     |     |     |        |     |     |       |     |      |     |
|------------|-----|-----|-----|--------|-----|-----|-------|-----|------|-----|
| red1_d16   | PSL | PDY | ATG | DCAPAC | DTA | GGN | NVESV | QNA | NDGT | 408 |
| red2_d16   | PSL | PDY | ATG | DCAPAC | DTA | GGN | NVESV | QNA | NDGT | 408 |
| aj002606   | PSL | PDY | ATG | DCAPAC | DTA | GGN | NVESV | QNA | NDGT | 408 |
| thcd_rhoer | PSL | PDY | ATG | DCAPAC | DTA | GGN | NVESV | QNA | NDGT | 408 |
| cama_psepu | PSL | PDY | ATG | DCAPAC | DTA | GGN | NVESV | QNA | NDGT | 422 |
| tera_pseep | PSL | PDY | ATG | DCAPAC | DTA | GGN | NVESV | QNA | NDGT | 403 |