

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. März 2001 (15.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/18190 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/00

(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; 67056 Ludwigshafen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/08581

(22) Internationales Anmeldedatum:
2. September 2000 (02.09.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 42 742.9 7. September 1999 (07.09.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EHRHARDT, Thomas [DE/DE]; Maulbronner Hof 49, 67346 Speyer (DE). LERCHL, Jens [DE/DE]; Im Steg 36, 68526 Ladenburg (DE). STITT NIGEL, Marc [GB/DE]; Brückenstrasse 16, 68535 Edingen-Neckarhausen (DE). ZRENNER, Rita [DE/DE]; Im Steg 36, 68526 Ladenburg (DE). SCHROEDER, Michael [DE/DE]; Talstrasse 23, 68259 Mannheim (DE).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



WO 01/18190 A2

(54) Title: DIHYDROOROTASE EXTRACTED FROM PLANTS

(54) Bezeichnung: DIHYDROOROTASE AUS PFLANZEN

(57) Abstract: The invention relates to a DNA which codes for a polypeptide having dihydroorotase (EC 3.5.2.3) activity. The invention also relates to the use of these nucleic acids for producing a test system.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft eine DNA codierend für ein Polypeptid mit Dihydroorotase (EC 3.5.2.3) Aktivität. Zudem betrifft die Erfindung die Verwendung dieser Nukleinsäure zur Herstellung eines Testsystems.

Dihydroorotase aus Pflanzen

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Identifizierung pflanzlicher Dihydroorotase als neues Ziel für herbizide Wirkstoffe. Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin DNA-Sequenzen kodierend für ein Polypeptid mit Dihydroorotase (EC 3.5.2.3)- Aktivität.

- 10 Zudem betrifft die Erfindung die Verwendung einer Nukleinsäure kodierend für ein Protein mit Dihydroorotase-Aktivität pflanzlichen Ursprungs zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der Dihydroorotase mit herbizider Wirkung, sowie Inhibitoren pflanzlicher Dihydroorotase identifiziert unter
- 15 Verwendung dieser Verfahren bzw. dieses Testsystems. Die vorliegende Erfindung betrifft darüberhinaus eine DNA Sequenz kodierend für ein Polypeptid mit Dihydroorotatdehydrogenase-Aktivität und seine Verwendung als Hilfsenzym in einem molekularen Testsystem. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung der Nukleinsäure
- 20 kodierend für pflanzliche Dihydroorotase zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der Dihydroorotase. Darüber hinaus betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Beseitigung von unerwünschtem Pflanzenwuchs dadurch gekennzeichnet, daß die zu beseitigenden Pflanzen mit einer Verbindung
- 25 behandelt werden, die spezifisch an Dihydroorotase, codiert durch eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder eine mit dieser DNA-Sequenz hybridisierenden DNA-Sequenz, bindet und deren Funktion inhibiert.

30

Pflanzen sind in der Lage, aus Kohlendioxid, Wasser und anorganischen Salzen ihre Zellkomponenten zu synthetisieren.

Dieser Prozeß ist nur möglich, indem biochemische Reaktionen zum

- 35 Aufbau organischer Substanzen genutzt werden. Pflanzen müssen die Nukleotide als Bestandteile der Nukleinsäuren de novo synthetisieren.

Sowohl die Enzymreaktionen der de novo Purinbiosynthese als auch

- 40 die Enzymreaktionen der de novo Pyrimidinbiosynthese sind zur Regulation des Nukleotidstoffwechsels wichtig. Eines dieser Enzyme ist die Dihydroorotase. Das Enzym katalysiert die Wasserabspaltung von Carbamoylaspartat und Cyclisierung zu Dihydroorotat. Das darauffolgende Enzym Dihydroorotatdehydrogenase setzt
- 45 Dihydroorotat zu Orotat über eine Redoxreaktion um, siehe Abbildung 1.

Gene, die für Dihydroorotasen kodieren, wurden aus verschiedenen Organismen isoliert. Aus Bakterien sind vollständige cDNA Sequenzen bekannt (GenBank Acc Nr. M97254, *Pseudomonas putida*, X84262 *Lactobacillus leichmannii*, AE000207 *Escherichia coli*, M97253
5 *Pseudomonas putida*, P74438 *Synechocystis*). In Eukaryonten ist die Dihydroorotase Bestandteil eines multifunktionalen Enzymkomplexes, welcher auf einer kodierenden Sequenz lokalisiert ist (z.B. X03881 *Drosophila melanogaster*). Auch in Hefe liegt die Dihydroorotase in einem Multienzymkomplex vor (Souciet et al., Mol. Gen.
10 Genet. 207 (2-3), 314-319 (1987)). In Pflanzen ist die Dihydroorotase nicht Bestandteil eines polyfunktionellen Polypeptids sondern liegt ähnlich wie in *E. coli* als ein separates Enzym vor. Eine pflanzliche Dihydroorotase wurde bisher nur aus *Arabidopsis thaliana* isoliert (Genbank Acc. Nr. AF000146; Zhou et al., Plant
15 Physiol. 114 (1997), 1569).

Der Nachweis der Eignung eines Enzyms als Herbizid-Target kann zum Beispiel durch Verringerung der Enzymaktivität mittels der Antisense-technik in transgenen Pflanzen gezeigt werden. Wird auf
20 diese Weise ein verringertes Wachstum bewirkt, so läßt sich damit auf eine Eignung des in seiner Aktivität reduzierten Enzyms als Wirkort für herbizide Wirkstoffe schließen. Beispielhaft wurde dies für die Acetolactat Synthase mit transgenen Kartoffelpflanzen gezeigt (Höfgen et al., Plant Physiology 107 (1995),
25 469-477).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es zu belegen, daß Dihydroorotase in Pflanzen ein geeignetes herbizides Target ist, die Isolierung einer vollständigen pflanzlichen cDNA kodierend für
30 das Enzym Dihydroorotase und deren funktionelle Expression in bakteriellen oder eukaryontischen Zellen, sowie die Herstellung eines effizienten und einfachen Testsystems für die Durchführung von Inhibitor-Enzym-Bindungsstudien.

35 Die Aufgabe wurde gelöst durch Isolierung eines für das pflanzliche Enzym Dihydroorotase kodierenden Gens, der Herstellung von Antisensekonstrukten der Dihydroorotase, sowie der funktionellen Expression der Dihydroorotase in bakteriellen oder eukaryotischen Zellen.

40

Ein erster Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine DNA-Sequenz SEQ-ID NO:1 enthaltend die Kodierregion einer pflanzlichen Dihydroorotase aus *Solanum tuberosum* (Kartoffel), siehe Beispiel 1 und 2.

45

Weiterer Gegenstand der Erfindung sind DNA-Sequenzen, die von dieser SEQ-ID NO:1 abgeleitet sind oder mit dieser hybridisieren und die für ein Protein kodieren, das die biologische Aktivität einer Dihydroorotase besitzt.

5

Pflanzen der Linien ROSa, die ein Antisensekonstrukt der Dihydroorotase tragen wurden näher charakterisiert. Die Pflanzen zeigen in unterschiedlichem Maße eine Wachstumsretardierung. Die Pflanzenlinie ROSa-40 ist so stark betroffen, daß keine Knollen

10 gebildet werden. Pflanzen dieser Linie sind im Gewächshaus nicht lebensfähig und müssen in vitro erhalten werden. Es läßt sich eine Korrelation zwischen Wachstumsretardierung und Reduktion der Dihydroorotase Proteinmenge feststellen. Dieser klare Zusammenhang weist Dihydroorotase eindeutig als neues Zielprotein für

15 herbizide Wirkstoffe aus, siehe Beispiel 3 - 7.

Um effiziente Hemmstoffe der pflanzlichen Dihydroorotase finden zu können, ist es notwendig, geeignete Testsysteme, mit denen Inhibitor-Enzym-Bindungsstudien durchgeführt werden können, zur

20 Verfügung zu stellen. Hierzu wird beispielsweise die komplette cDNA-Sequenz der Dihydroorotase aus *Solanum tuberosum* in einen Expressionsvektor (pQE, Qiagen) kloniert und in *E. coli* überexprimiert, siehe Beispiel 8.

25 Alternativ kann jedoch die Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 beispielsweise in anderen Bakterien, in Hefen, Pilzen, Algen, Pflanzenzellen, Insektenzellen oder Säugerzellen exprimiert werden.

30 Das mit Hilfe der erfindungsgemäßen Expressionskassette exprimierte Dihydroorotase-Protein eignet sich besonders zur Auffindung von für die Dihydroorotase spezifischen Hemmstoffen.

Dazu kann die Dihydroorotase beispielsweise in einem Enzymtest

35 eingesetzt werden, bei dem die Aktivität der Dihydroorotase in An- und Abwesenheit des zu testenden Wirkstoffs ermittelt wird. Aus dem Vergleich der beiden Aktivitätsbestimmungen läßt sich eine qualitative und quantitative Aussage über das Hemmverhalten des zu testenden Wirkstoffes machen.

40

Der bisher entwickelte enzymatische Nachweis zur Messung der Dihydroorotaseaktivität nach Mazus und Buchowicz, (*Acta Biochimica Polonica* (1968), 15 (4), 317-325) beruht auf dem Nachweis des gebildeten Orotats in einem mit Dihydroorotatdehydrogenase gekop-

45 pelten Reaktionsansatz bei 280 nm. Dieser Assay ist nicht für eine Massentestung geeignet. Daher wurde das Verfahren so gestaltet, daß gebildetes NADH bei 340 nm erfaßt werden kann. Dies

setzt eine hohe Aktivität des Hilfsenzym, der Dihydroorotatdehydrogenase voraus. Eine käuflich erhältliche Präparation aus *Zymobacterium oroticum* (Sigma) erwies sich als zu unrein um die NADH-Bildung verfolgen zu können. Um eine Massentestung durchführen zu können, muß die spezifische Dihydroorotatdehydrogenase-Aktivität mindestens zehnfach höher sein, als in der käuflichen Präparation vorliegend. Eine solche Aktivität konnte erhalten werden nach Isolation einer pflanzlichen Dihydroorotatdehydrogenase und Expression in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*). Daher wurde ein

10 Testsystem auf Basis der Kopplung pflanzlicher Dihydroorotase und pflanzlicher Dihydroorotatdehydrogenase entwickelt. Dazu wurde beispielsweise das Gen kodierend für eine Dihydroorotatdehydrogenase aus *Arabidopsis thaliana* isoliert (siehe Genbank Acc. Nr. x62909, Minet et al., Plant J. (1992), 2 (3), 417-422; Beispiel

15 9 - 11.

- Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Testsystems kann eine Vielzahl von chemischen Verbindungen schnell und einfach auf herbizide Eigenschaften überprüft werden. Das Verfahren gestattet es,
- 20 reproduzierbar aus einer großen Anzahl von Substanzen gezielt solche mit großer Wirkstärke auszuwählen, um mit diesen Substanzen anschließend weitere, dem Fachmann geläufige vertiefte Prüfungen durchzuführen.
- 25 Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Identifizierung von Substanzen mit herbizider Wirkung, die die Dihydroorotase Aktivität in Pflanzen hemmen, bestehend aus
- a) der Herstellung von transgenen Pflanzen, Pflanzengewebe,
- 30 oder Pflanzenzellen, die eine zusätzliche DNA-Sequenz codierend für ein Enzym mit Dihydroorotase Aktivität enthalten und in der Lage sind eine enzymatisch aktive Dihydroorotase überzuexprimieren;
- 35 b) das Aufbringen einer Substanz auf transgene Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile sowie auf nicht-transformierten Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile;
- 40 c) das Bestimmen des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der transgenen und der nicht-transformierten Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile nach der Aufbringung der chemischen Substanz; und

- d) dem Vergleich des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der transgenen und der nicht-transformierten Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile nach der Aufbringung der chemischen Substanz;

5

wobei die Unterdrückung des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der nicht-transformierten Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile ohne jedoch das Wachstum oder die Überlebensfähigkeit der transgenen Pflanzen, Pflanzenzellen,

- 10 Pflanzengewebe oder Pflanzenteile stark zu unterdrücken, belegt, daß die Substanz aus b) herbizide Aktivität zeigt und die Dihydroorotase Enzymaktivität in Pflanzen inhibiert.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Beseitigung von unerwünschtem Pflanzenwuchs dadurch gekennzeichnet, daß die zu beseitigenden Pflanzen mit einer Verbindung behandelt werden, die spezifisch an Dihydroorotase, codiert durch eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder eine mit dieser DNA-Sequenz hybridisierenden DNA-Sequenz, bindet und deren Funktion inhibiert.

20

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen mit herbizider Wirkung, die mit dem oben beschriebenen Testsystem identifizierbar sind.

- 25 Inhibitoren der Dihydroorotase mit herbizider Wirkung können als Defolianten, Desiccants, Krautabtötungsmittel und insbesondere als Unkrautvernichtungsmittel verwendet werden. Unter Unkraut im weitesten Sinne sind alle Pflanzen zu verstehen, die an Orten aufwachsen, an denen sie unerwünscht sind. Ob die mit Hilfe des
- 30 erfindungsgemäßen Testsystems gefundenen Wirkstoffe als totale oder selektive Herbizide wirken, hängt unter anderem von der angewandten Menge ab.

- Inhibitoren der Dihydroorotase mit herbizider Wirkung können
- 35 beispielsweise gegen folgende Unkräuter verwendet werden:

Dikotyle Unkräuter der Gattungen:

Sinapis, Lepidium, Galium, Stellaria, Matricaria, Anthemis, Galinsoga, Chenopodium, Urtica, Senecio, Amaranthus, Portulaca,

- 40 Xanthium, Convolvulus, Ipomoea, Polygonum, Sesbania, Ambrosia, Cirsium, Carduus, Sonchus, Solanum, Rorippa, Rotala, Lindernia, Lamium, Veronica, Abutilon, Emex, Datura, Viola, Galeopsis, Papaver, Centaurea, Trifolium, Ranunculus, Taraxacum.

- 45 Monokotyle Unkräuter der Gattungen:

Echinochloa, Setaria, Panicum, Digitaria, Phleum, Poa, Festuca, Eleusine, Brachiaria, Lolium, Bromus, Avena, Cyperus, Sorghum,

Agropyron, Cynodon, Monochoria, Fimbristylis, Sagittaria, Eleocharis, Scirpus, Paspalum, Ischaemum, Sphenoclea, Dactyloctenium, Agrostis, Alopecurus, Apera.

- 5 Gegenstand der Erfindung sind auch Expressionskassetten, deren Sequenz für eine Dihydroorotase aus *Solanum tuberosum* oder deren funktionelles Äquivalent kodieren. Die Nukleinsäuresequenz kann dabei z.B. eine DNA- oder eine cDNA-Sequenz sein.
- 10 Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine erfindungsgemäße Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz,
- 15 einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das Dihydroorotase-Gen operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung
- 20 von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.
- 25 Die Herstellung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten Dihydroorotase-DNA Sequenz und einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und
- 30 J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in*
- 35 *Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

Die Sequenzhomologie zwischen Dihydroorotase aus *Solanum tuberosum* und aus *Arabidopsis thaliana* beträgt auf Protein-Ebene

- 40 78% Identität. Die Homologie wurde mit dem Programm BLASTP erhalten (Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* (1997) 25, 3389-3402), siehe Beispiel 2.

Gegenstand der Erfindung sind auch funktionell äquivalente DNA-Sequenzen, die für ein Dihydroorotase-Gen kodieren und die bezogen auf die Gesamtlänge des Gens eine Sequenzhomologie mit der DNA-Sequenz SEQ-ID NO: 1 von 40 bis 100 % aufweisen.

5

Bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind funktionell äquivalente DNA-Sequenzen, die für ein Dihydroorotase-Gen kodieren und die bezogen auf die Gesamtlänge des Gens eine Sequenzhomologie mit der DNA-Sequenz SEQ-ID NO: 1 von 60 bis 100 % aufweisen.

10

Besonders bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind funktionell äquivalente DNA-Sequenzen, die für ein Dihydroorotase-Gen kodieren und die bezogen auf die Gesamtlänge des Gens eine Sequenzhomologie mit der DNA-Sequenz SEQ-ID NO: 1 von 80 bis

15 100 % aufweisen.

Funktionell äquivalente Sequenzen, die für ein Dihydroorotase-Gen kodieren, sind erfindungsgemäß solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz noch die gewünschten Funktionen be-

20 sitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den Kodon-Gebrauch einer Pflanze angepaßte, künstliche Nukleotid-Sequenzen.

25

Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten für eine Dihydroorotase kodierende Sequenz, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigen. Mutationen umfassen

30 Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation dieser Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann 35 z.B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen kodierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren Funk-

40 tion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abgeschwächt oder verstärkt ist.

Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann darüberhinaus auch zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, filamen-

45 tösen Pilzen und Algen mit dem Ziel der Herstellung von ausreichenden Mengen des Enzyms Dihydroorotase eingesetzt werden.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Protein aus *Solanum tuberosum* gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenz SEQ-ID NO:2 bzw. Derivate oder Teile dieses Proteins mit Dihydroorotase Aktivität. Im Vergleich zu der Dihydroorotase aus *Arabidopsis thaliana* beträgt die Homologie auf Aminosäureebene 78 % Identität.

Gegenstand der Erfindung sind auch pflanzliche Proteine mit Dihydroorotase Aktivität mit einer Aminosäuresequenzhomologie zu der *Solanum tuberosum* Dihydroorotase von 20 - 100 % Identität.

Bevorzugt sind pflanzliche Proteine mit Dihydroorotase Aktivität mit einer Aminosäuresequenzhomologie zu der *Solanum tuberosum* Dihydroorotase von 50 - 100 % Identität.

Besonders bevorzugt sind pflanzliche Proteine mit Dihydroorotase Aktivität mit einer Aminosäuresequenzhomologie zu der *Solanum tuberosum* Dihydroorotase von 80 - 100 % Identität.

Weitere Aufgabe der Erfindung war die Überexpression des Dihydroorotase Gens in Pflanzen zur Herstellung von Pflanzen, die tolerant gegenüber Inhibitoren der Dihydroorotase sind.

Durch Überexpression der für eine Dihydroorotase kodierenden Gensequenz SEQ-ID NO: 1 in einer Pflanze wird eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der Dihydroorotase erreicht. Die derart hergestellten transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Die Wirksamkeit der Expression des transgen exprimierten Dihydroorotase-Gens kann beispielsweise in vitro durch Sproßmeristemvermehrung oder durch einen Keimungstest ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des Dihydroorotase-Gens und deren Auswirkung auf die Resistenz gegenüber Hemmstoffen der Dihydroorotase an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette, enthaltend die DNA SEQ-ID No. 1, die durch zusätzliche Expression der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 tolerant gegenüber Inhibitoren der Dihydroorotase geworden sind, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume,

Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, sowie Leguminosen.

Weiterer Gegenstand der Erfindung sind Pflanzen, die nach Expression der DNA-Sequenz-SEQ ID NO:1 in der Pflanze einen erhöhten UMP-Gehalt aufweisen.

Erhöhung des Uridin-5'-phosphat (UMP)-Gehaltes bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten UMP- Biosyntheseleistung durch funktionelle Überexpression des Dihydroorotase-Gens in der Pflanze gegenüber der nicht gentechnisch modifizierten Pflanze für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.

Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in den Apoplasten, in Plastiden, die Vakuole, das Mitochondrium, das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein Fehlen entsprechender operativer Sequenzen einen Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, gewährleisten (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996), 285-423).

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-Transformationsvektor pBinAR eingebaut werden (siehe Beispiel 3).

Als Promotoren der erfindungsgemäßen Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21(1980), 285-294). Dieser Promotor enthält unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202).

Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen Dihydroorotase-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant.Mol. Biol. (1993) 22, 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/1919443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer (EP 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., Plant J. (1992) 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP0335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-

induzierbarer (WO 93/21334) Promotor sind in der Literatur beschrieben und können u.a. verwendet werden.

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die
5 Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Biosynthese von Purinen bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus
10 Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J., (1989) 8, 2445-251).

Mit Hilfe eines samenspezifischen Promotors kann ein Fremdprotein stabil bis zu einem Anteil von 0,67% des gesamten löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen exprimiert
15 werden (Fiedler und Conrad, Bio/Technology (1995) 10, 1090-1094). Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann daher beispielsweise einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den Phaseolin-Promotor, den USP- oder LEB4-Promotor), das LEB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal enthalten.

20 Die inserierte Nukleotid-Sequenz kodierend für eine Dihydroorotase kann synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten. Im allgemeinen werden synthetische Nukleotid-
25 Sequenzen mit Kodons erzeugt, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden. Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente
30 manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

35 Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beispielsweise beschrieben, die gewünschte Eigenschaft der Erhöhung des UMP-Gehaltes in der Pflanze durch Überexpression des Dihydroorotase-Gens in Kulturpflanzen vermitteln. Solche ar-
40 tifizierten DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine, die Dihydroorotase-Aktivität aufweisen oder durch *in vitro*-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind kodierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der
45 für die Wirtspflanze spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit pflanzen genetischen

Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.

Als weitere erfindungsgemäße geeignete äquivalente Nukleinsäure-
5 Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein pflanzliches Dihydroorotase -Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzymatischer Aktivität sein oder eine
10 antigene Polypeptidsequenz mit deren Hilfe ein Nachweis auf Dihydroorotase -Expression möglich ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative Proteinsequenz, wie z.B. ein Signal- oder Transitpeptid, das das Dihydroorotase-Protein an den gewünschten Wirkort leitet.

15 Zweckmäßigerweise sollten die erfindungsgemäßen Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der
20 Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der erfindungsgemäße Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch
25 fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die erfindungsgemäße Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den erfindungsgemäßen Promotor, eine beliebige Sequenz und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig
30 austauschbar.

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen,
35 Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primerrepair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden
40 der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids

pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine Dihydroorotase kodierenden DNA wird eine erfindungsgemäße Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S.71-119 beschrieben.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, der biolistische Ansatz mit der Genkanone, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 sowie in Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991) 205-225 beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711).

Mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie Getreide, Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies sowie Leguminosen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakteriensuspension gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Der Biosyntheseort von Pyrimidinen ist im allgemeinen das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression des Dihydroorotase-Gens sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Pyrimidin-Biosynthese nicht auf das Blattgewebe beschränkt sein muß, son-

dern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze beispielsweise in fetthaltigen Samen - gewebespezifisch erfolgen kann.

Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen Dihydroorotase-Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die erfindungsgemäßen Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette zur Transformation von Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des Dihydroorotase Gehaltes in der Pflanze.

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

Beispiele

Gentechnische Verfahren, die den Ausführungsbeispielen zugrunde liegen:

Allgemeine Klonierungsverfahren

Klonierungsverfahren wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylon Membranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *Escherichia coli* Zellen, Anzucht von Bakterien und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt.

Sequenzanalyse rekombinanter DNA

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma ABI nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467). Fragmente resultierend aus einer Polymerase Kettenreaktion wurden zur Vermeidung von Polymerasefehlern in zu exprimierenden Konstrukten sequenziert und überprüft.

Beispiel 1

10 Isolation einer cDNA codierend für eine funktionelle pflanzliche Dihydroorotase

Ein Klon kodierend für Dihydroorotase wurde aus Kartoffel über funktionelle Komplementation einer E.coli Mutante erhalten. Es wurde die Mutante CGSC5152 (CS101-2U5) des E. coli Genetic Stock Centers verwendet, die eine Mutation im pyrC Genlokus kodierend für eine Dihydroorotase trägt. Die Komplementation erfolgte durch Elektrotransformation kompetenter Zellen des Stammes CGSC5152 mit einer cDNA Bank in dem Vektorplasmid pBS SK-. Die zugrunde liegende Lambda ZAPII Bank (Stratagene) wurde nach Standardvorschriften ungerichtet mit EcoRI/NotI Linkern kloniert. Die RNA-Matrize für die cDNA wurde aus sink leaves (kleiner 1 cm Blättchen von 10 Wochen alten im Gewächshaus gezogenen Kartoffelpflanzen) isoliert.

Die transformierten E. coli Zellen wurden auf Minimalmedium M9 plattiert (Sambrook et al., 1989), das zusätzlich Methionin (20 mg/l), Ampicillin (100 mg/l) und IPTG (2.5 mM) enthielt. Es wurden insgesamt 4 Microgramm der Bank in 8 Ansätzen transformiert und es konnten 36 Klone erhalten werden, die sich nach Untersuchung durch Restriktionsspaltung als gleich erwiesen.

Beispiel 2

35 Sequenzanalyse der cDNA Klone codierend für ein Protein mit Dihydroorotase Aktivität.

Die resultierenden 36 cDNA Klone kodieren für ein Polypeptid mit Homologie zu Dihydroorotasen aus anderen Organismen. Die Homologie wurde mit dem Programm BLASTP erhalten. (Altschul et al., Nucleic Acids Res. (1997) 25, 3389-3402). Demnach ist das Protein zu 78 % identisch zur Dihydroorotase aus Arabidopsis thaliana, 58 % zu Synechocystis, 55% zu E. coli und Pseudomonas putida. Der längste Klon wurde pyrCSt5 genannt. Das Plasmid beträgt die Bezeichnung pBSSK-pyrCSt5. Die cDNA (siehe SEQ-ID No. 1) hat einen offenen Leseraster von 1046 Basenpaaren mit einem Stop-Codon in Position 1047-1049. Die Aminosäuresequenz beginnt mit

der dritten Base im Leseraster und kann in ein 348 Aminosäuren langes Polypeptid übersetzt werden (siehe SEQ-ID No. 2). Dies entspricht der Länge prokaryotischer Dihydroorotase-codierender Sequenzen.

5

Aufgrund des Leserasters der vorliegenden cDNA Sequenz läßt sich nicht mit Sicherheit ableiten, ob es sich möglicherweise um eine plastidär lokalisierte Form oder eine zytosolische Form handeln könnte.

10

Beispiel 3

Erzeugung pflanzlicher Expressionskassetten

- 15 In das Plasmid pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1980), 8711) wurde ein 35S CaMV Promotor als EcoRI-KpnI-Fragment (entsprechend den Nukleotiden 6909-7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285) inseriert. Das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmides pTiACH5 (Gielen
20 et al., EMBO J. 3 (1984), 835), Nukleotide 11749-11939 wurde als PvuII-HindIII-Fragment isoliert und nach Addition von SphI-Lin- kern an die PvuII-Schnittstelle zwischen die SphI-HindIII Schnittstelle des Vektors kloniert. Es entstand das Plasmid pBi- nAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990), 221-230).
25 Die Klonierung eines Konstruktes von pyrCSt5 in antisense-Orien- tierung in pBinAR erfolgte über eine Asp718 Schnittstelle (in- terne Schnittstelle bei 964 bp) und eine BamHI Schnittstelle (aus dem Polylinker).

30 Beispiel 4

Herstellung transgener Kartoffelpflanzen

- Die Transformation von Kartoffelpflanzen (cv. Solara) mit Hilfe
35 von Agrobacterium tumefaciens erfolgte mit dem entsprechenden Konstrukt pBinAR-anti-pyrCSt5. Das Plasmid wurde in Agrobacterium tumefaciens C58C1:pGV2260 transformiert (Deblaere et al., Nucl. Acids. Res. 13 (1984), 4777-4788). Zur Transformation von Kar- toffel nach Rocha-Sosa et al. (EMBO J., 8 (1988), 23-29) wurde
40 eine 1:50 Verdünnung einer Übernachtskultur einer positiv trans- formierten Agrobakterienkolonie in Murashige-Skoog Medium (Physiol. Plant., 15 (1962), 473) benutzt. Blattscheiben steriler Pflanzen (zu je ca. 1 cm²) wurden in einer Petrischale mit einer 1:50 Agrobakterienverdünnung für 5-10 Minuten inkubiert. Es
45 folgte eine 2-tägige Inkubation in Dunkelheit bei 20°C auf MS-Me- dium. Die Kultivierung wurde anschließend mit 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit weitergeführt. Im wöchentlichem Rhythmus wurde

16

auf MS-Medium mit 500 mg/l Claforan (Cefotaxime-Natrium), 50 mg/l Kanamycin und Pflanzenhormonen (Rocha-Sosa et al., EMBO J., 8, 23-29, 1989) und 1,6 g/l Glukose zur Sprossinduktion umgesetzt. Wachsende Sprosse wurden auf MS-Medium mit 2% Saccharose, 250 mg/l Claforan und 0,8% Bacto-Agar überführt.

Regenerierte Sprosse werden auf 2MS-Medium mit Kanamycin und Claforan erhalten, nach Bewurzelung in Erde überführt und nach Kultivierung für zwei Wochen in einer Klimakammer im 16 Stunden hell/8 Stunden dunkel-Rhythmus bei 50% Luftfeuchte auf Fremdgenexpression bzw. veränderte Metabolitgehalte und phänotypische Wachstumsmerkmale untersucht. Veränderte Nukleotidgehalte können z.B. nach der Methode von Stitt et al. (FEBS Letters, 145 (1982), 217-222) bestimmt werden.

15

Beispiel 5

Analyse von Gesamt-RNA aus pflanzlichen Geweben

20 Gesamt-RNA aus pflanzlichen Geweben wurde wie bei Logemann et al., Anal. Biochem. 163 (1987), 21 isoliert. Für die Analyse wurden jeweils 20 Microgramm RNA in einem Formaldehyd-haltigen 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt und auf Duralon UV Membranen (Stratagene) überführt.

25

Zum Nachweis spezifischer Transkripte wurden nach Herstellerangaben Digoxigenin-markierte Sonden mittels PCR hergestellt und zur Hybridisierung verwendet (DIG EasyHyb, Boehringer). Anschließend wurden die Membranen 3 x 20 Min in Waschpuffer (2x SSC, 0,1% SDS) bei 60 °C gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels des DIG-Detektionssystems von Boehringer mit CDP-Star als Substrat durch Lumineszenz und Exposition auf Hyperfilm ECL (Amersham).

35 Erhaltene individuelle transgene Pflanzen der Linien ROSa-34, -31, -10, -19, -9 und -3 sind als Testpflanzen auf RNA Ebene in Abbildung 3 dargestellt. Erkennbar ist eine Bande bei 1,6 kB entsprechend der erwarteten Transkriptgröße der Dihydroorotase und bei den Pflanzen ROSa-3, -9, -31, -34 das 1,1 kB Antisense-Transkript. Insbesondere für Pflanze ROSa-9 ist eine deutliche Reduktion der RNA-Menge erkennbar.

Beispiel 6

45 Nachweis des Proteins der Kartoffel Dihydroorotase in Knollen- und Blattgeweben.

Zur Erzeugung eines polyklonalen Serums gegen das Dihydroorotase-Polypeptid wurde eine Peptidsequenz aus der Aminosäuresequenz der Dihydroorotase aus Kartoffel gewählt. Das Peptid LGTDSAPHDRRRKEC wurde von einem kommerziellen Anbieter synthetisiert (Eurogentec, 5 Seraing, Belgium) und über das C-terminale Cystein an KLH (key-hole limpet protein) gekoppelt. Das Konjugat wurde ebenfalls vom kommerziellen Anbieter (Eurogentec) zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt und Antiseren gegen das Peptid gewonnen. Das Antiserum erkennt in Western-Blot Experimenten spezifisch das Poly- 10 peptid aus Kartoffel. Zu diesem Zweck wurde Protein unter denaturierenden Bedingungen einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen, auf Nitrocellulosemembranen transferiert und mittels Immundetektion nach Angaben des Herstellers nachgewiesen (ECL-System, Amersham). Mithilfe des Antiserums wurden transgene 15 Pflanzen der ROSa-Linien charakterisiert. Die Linien -3, -9 und -40 zeigen eine unterschiedlich starke Verringerung des Proteins im Blatt, siehe Abbildung 2. Pflanze -40 bildet keine Knollen. Pflanzen -3 und -9 zeigen eine entsprechend starke Reduktion der Dihydroorotase Proteinmenge auch in Knollen.

20

Beispiel 7

Phänotypische Analyse der transgenen Pflanzen.

25 Pflanzen der Linien ROSa, die ein Antisensekonstrukt der Dihydroorotase tragen wurden näher charakterisiert. Die Pflanzen zeigen in unterschiedlichem Maße eine Wachstumsretardierung. Die Pflanzenlinie ROSa-40 ist so stark betroffen, daß keine Knollen gebildet werden. Pflanzen dieser Linie sind im Gewächshaus nicht 30 lebensfähig und müssen in vitro erhalten werden. Es läßt sich eine Korrelation zwischen Wachstumsretardierung und Reduktion der Dihydroorotase Proteinmenge feststellen. Dieser klare Zusammenhang weist Dihydroorotase aus Kartoffel eindeutig als neues Zielprotein für herbizide Wirkstoffe aus.

35

Beispiel 8

Erzeugung von Überexpressionsvektoren in E. coli

40 Es wurden aus der ermittelten Sequenz folgende Oligonukleotidsequenzen abgeleitet und mit einer BamHI-Restriktionsschnittstelle sowie zwei überhängenden Basen versehen.

1. 5'-Primer aaggatccGCAAAAATGGAGCTCTCA

45

2. 3'-Primer aaggatccTCAGAGAGGAGCCGGCAAC

18

Die PCR-Reaktionsgemische enthielten 8 ng/microliter pBSSK-pyrCSt5 DNA, 0,5 μ M der entsprechenden Oligonukleotide, 200 μ M Nukleotide (Pharmacia), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25°C), 1,5 mM MgCl₂) und 0.02 U/ μ l Taq Polymerase (Perkin Elmer).

5 Die Amplifikationsbedingungen wurden wie folgt eingestellt:

	Denaturierungstemperatur:	92°C, 1 min
	Anlagerungstemperatur:	52°C, 1 min
	Elongationstemperatur:	72°C, 2,5 min
10	Anzahl der Zyklen:	30

Die PCR-Fragmente wurden über BamHI in den Überexpressionsvektor pQE9 kloniert und zur Proteinproduktion mittels IPTG-Induktion nach Standardmethoden eingesetzt. (siehe Handbuch: The QiaEx-

15 pressionist, Qiagen, Hilden).

Beispiel 9

Testsystem zur Messung der Dihydroorotase-Aktivität

20

Der bisher entwickelte enzymatische Nachweis zur Messung der Dihydroorotaseaktivität nach Mazus und Buchowicz, (Acta Biochimica Polonica (1968), 15(4), 317-325) beruht auf der Detektion des gebildeten Orotats in einem mit Dihydroorotatdehydrogenase gekoppelten Reaktionsansatz bei 280 nm. Dies setzt eine hohe Aktivität des Hilfsenzym, der Dihydroorotatdehydrogenase voraus. Eine käuflich erhältliche Präparation aus *Zymobacterium oroticum* (Sigma) erwies sich als zu unrein.

25

30 Um eine Massentestung durchführen zu können, muß die spezifische Dihydroorotatdehydrogenase-Aktivität mindestens zehnfach höher sein, als in der käuflichen Präparation vorliegend. Eine solche Aktivität konnte erhalten werden durch Präparation einer Dihydroorotatdehydrogenase Aktivität aus *Neurospora crassa* (R.W. Miller, Methods in Enzymology LI, 1978, 63 - 69) nach Klonierung einer pflanzlichen Dihydroorotatdehydrogenase und deren Expression in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*). Eine weitere Verbesserung des Testsystems wurde durch Messung bei 340 nm erreicht.

35

40 Es wurde zunächst eine Dihydroorotatdehydrogenase aus *Arabidopsis thaliana* isoliert. (siehe Genbank Acc. Nr. X62909, Minet et al., Plant J. (1992), 2 (3), 417-422).

Es wurden aus dem Datenbankeintrag der Dihydroorotatdehydrogenase
45 Sequenz folgende Oligonukleotidsequenzen abgeleitet

1. 5'-Primer aaggatccatggccggaagggctg

2. 3'-Primer aaggatccttagtggtggtggtggtggtgtttgtgggatggggc

- 5 Die PCR-Reaktionsgemische enthielten 10 ng Plasmid DNA einer Arabidopsis thaliana cDNA im Vektor pFL61 (ATCC 77600), 0,5 microM der entsprechenden Oligonukleotide, 200 µM Nukleotide (Pharmacia), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25°C), 1,5 mM MgCl₂) und 0.02 U/µl Taq Polymerase (Perkin Elmer). Die Amplifikation
- 10 tionsbedingungen wurden wie folgt eingestellt:

	Denaturierungstemperatur:	92°C, 0,5 min
	Anlagerungstemperatur:	60°C, 0,5 min
	Elongationstemperatur:	72°C, 1,5 min
15	Anzahl der Zyklen:	35

Das resultierende PCR-Fragment wurde über die BamHI Schnittstellen zunächst in den Hefeexpressionsvektor pYES2 (Invitrogen) kloniert. Das erzeugte Konstrukt wurde pYES2-pyrDA genannt.

20

Beispiel 10

Klonierung einer pflanzlichen Dihydroorotatdehydrogenase aus Tabak

25

- Weiterhin wurde das in Beispiel 9 beschriebene PCR-Fragment für ein heterologes Screening einer Tabak Phagen cDNA Bank eingesetzt. Die für die Erstellung der Tabak Phagen cDNA Bank eingesetzte cDNA wurde aus RNA von Tabakzellsuspensionskulturen erhalten.
- 30 ten. Die Erstellung der cDNA Bank erfolgte nach Angaben des Herstellers (Stratagene). Es wurden $3,0 \times 10^5$ Lambda Phagen der cDNA-Bibliothek aus Nicotiana tabacum auf Agarplatten mit E. coli XLI-Blue als Bakterienstamm ausplattiert.

- 35 Die Phagen-DNA wurde mittels Standardverfahren (Sambrook et al. (1989); Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) auf Nylonfilter (Duralon UV, Stratagene) überführt und auf den Filtern fixiert. Als Hybridisierungssonde diente das oben beschriebene PCR-Fragment, das mit Hilfe des Markierungs- und
- 40 Detektionssystems (Boehringer, Mannheim) nach Herstellerangaben DIG-markiert wurde. Die Hybridisierung der Membran erfolgte in DIG EasyHyb (Boehringer) bei 42°C für 16 Stunden. Anschließend wurden die Filter 3 x 20 Minuten in 2 x SSC, 0,1 % SDS bei 60°C gewaschen. Positiv hybridisierende Phagen wurden mittels des DIG-
- 45 Detektionssystems von Boehringer mit CDP-Star als Substrat durch

Lumineszenz auf Hyperfilm ECL (Amersham) sichtbar gemacht und durch Standardtechniken gereinigt und vereinzelt.

- Es resultierten zehn identische Klone, von denen der Klon pyrDT10 vollständig sequenziert wurde (SEQ-ID No. 3). Ein EcoRI Verdau der Klones zeigt ein 1962 Basenpaar großes EcoRI-Fragment mit einem offenen Leseraster von 458 Aminosäuren, einem Startcodon in Position 305-307 und einem Stopcodon in Position 1679-1681. Die abgeleitete Aminosäuresequenz (SEQ-ID No. 4) der Dihydroorotatdehydrogenase aus Tabak zeigt 72% Identität zur Aminosäuresequenz aus Arabidopsis, 51% zu Ratte, 43% zu Hefe und 37% zu E. coli. Die Identität wurde mit dem Programm BLASTP erhalten. (Altschul et al., Nucleic Acids Res. (1997) 25, 3389-3402).
- 15 Es wurden aus der ermittelten Sequenz folgende Oligonukleotidsequenzen abgeleitet und mit einer KpnI-Restriktionsschnittstelle sowie zwei überhängenden Basen versehen.

1. 5'-Primer ggggtaccatgagacaaaggggttgatt
- 20 2. 3'-Primer ggggtaccttagtggtggtggtggtggtggagaggagccggcaacca

- Die PCR-Reaktionsgemische enthielten 5 ng/μl pBSSK-pyrDT10 DNA, 0,5 μM der entsprechenden Oligonukleotide, 200 μM Nukleotide (Pharmacia), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25°C), 1,5 mM MgCl₂ und 0,02 U/μl Taq Polymerase (Perkin Elmer). Die Amplifikationsbedingungen wurden wie folgt eingestellt:
- 25

- | | |
|---------------------------|----------------|
| Denaturierungstemperatur: | 92°C, 1 min. |
| 30 Anlagerungstemperatur: | 52°C, 1 min. |
| Elongationstemperatur: | 72°C, 2,5 min. |
| Anzahl der Zyklen: | 30 |

- Das PCR-Fragment der Tabak Dihydroorotatdehydrogenase wurde über KpnI-Schnittstellen in den Hefeexpressionsvektor pYES2 (Invitrogen) kloniert. Dieses Konstrukt (pYES-pyrDT10) und das Arabidopsis Dihydroorotatdehydrogenase-Konstrukt pYES2-pyrDAT wurden zur Komplementation der ural-Hefemutante eingesetzt (Minet et al., Gene (1992), 121(2), 393-6). Erhaltene Hefeklone wurden in Flüssigkultur über Nacht in Vollmedium mit 1% Galaktose angezo-
- 40 gen.

Beispiel 11

- 45 Enzymgewinnung pflanzlicher Dihydroorotase und Dihydroorotatdehydrogenase und Messung der Dihydroorotaseaktivität

- Die E.coli-Expressionskulturen der Dihydroorotase und die Hefe-expressionskultur enthaltend die Dihydroorotatdehydrogenase aus Tabak (oder Arabidopsis) wurden jeweils getrennt mittels Druckaufschlußverfahren an der French Press unter Maximaldruck in
- 5 einer 20 ml Druckkammer oder mit Hilfe einer Glaskugelmühle (IMA-Desintegrator) aufgeschlossen. 10 ml Puffer (0,1M KH_2PO_4 ; pH 7,5; 0,4M Saccharose, 0,1 mM DTT) werden pro 1 g Zellpellet verwendet. Durch Zugabe der 2,5 fachen Menge an Glasperlen ($d=0,5\text{mm}$) wird
- 10 das Pellet in der Glaskugelmühle 20 min bei 4°C und 2500rpm aufgeschlossen. Der Aufschluß wird bei 4°C und 100.000g für 20 Minuten zentrifugiert. Die Bestimmung der Enzymaktivität wurde in einem photometrischen Assay durch Messung bei 340 nm an einem Photometer (Uvikon 933, Kontron) durchgeführt. Die Wahl der Überexpressionsvektoren ermöglichte auch eine Aufreinigung der Di-
- 15 hydroorotase und der Dihydroorotatdehydrogenase über den Histidin-Anker nach Standardmethoden in einem Schritt unter nativen Bedingungen, wenn kein DTT im Aufschlußpuffer verwendet wurde (vergl. auch Handbuch: The QiaExpressionist, Qiagen, Hilden). Die Eluate wurden durch Dialyse umgepuffert in 20 mM Kaliumphosphat-
- 20 puffer pH 6.1; 5 mM MgCl_2 ; 1 mM DTT; 10 mM Cystein; 10 μM ZnCl_2 , 20 μM NAD. Je 10-100 μl der umgepufferten Enzymfraktion wurden auf 700 μl mit Puffer aufgefüllt und gegen eine Referenzküvette mit 700 μl Reaktionspuffer und 100 μl eines Proteinhomogenats untransformierter E. coli Kultur gemessen. Die Reaktion wurde mit 7 mM
- 25 Carbamyl-Aspartat gestartet. Es wurden gleiche Mengen Gesamtprotein für die Messungen der untransformierten bzw. transformierten E. coli Extrakte eingesetzt.

- Alternativ zu pflanzlichen Dihydroorotatdehydrogenase-Aktivitäten
- 30 exprimiert in Hefen kann eine Dihydroorotatdehydrogenase-Aktivität präpariert aus *Neurospora crassa* eingesetzt werden, siehe R.W. Miller, Dihydroorotatdehydrogenase, (in: Methods in Enzymology 51 (1978), 63 - 69).

- 35 Alternativ kann die Dihydroorotase auch ohne Kopplung an Dihydroorotatdehydrogenase in einem colorimetrischen Test geringerer Sensitivität nach Prescott und Jones (Anal. Biochem. (1969) 32, 408-419) gemessen werden. Dazu wurde die Dihydroorotaseaktivität in 50 mM Tris-HCl, 1 mM Dihydroorotate (pH 8,5) nach Inkubation
- 40 bei 37°C durch Nachweis des gebildeten Carbamoylaspartats gemessen. Voraussetzung hierfür ist die in diesem Beispiel beschriebene Proteinpräparation mit hoher Proteinaktivität.

- Die mit den beschriebenen Testsystemen gemessene Aktivität der
- 45 Dihydroorotase aus Kartoffel kann mit bekannten Dihydroorotase Inhibitoren, wie 6-L-Thiodihydroorotat oder 2-Oxo-1,2,3,6-Tetra-

hydropyrimidin-4,6-Dicarboxylat (Christopherson et al., Bio-chemical Society Transactions 23: 888-893, 1995) reduziert werden.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Patentansprüche

1. DNA-Sequenz, enthaltend die Kodierregion einer pflanzlichen
5 Dihydroorotase, dadurch gekennzeichnet, daß diese DNA-Sequenz
die Nukleotidabfolge SEQ-ID NO:1 aufweist.
2. DNA-Sequenzen, die mit der DNA-Sequenz SEQ-ID NO: 1 gemäß An-
spruch 1 oder Teilen davon oder Derivaten, die durch Inser-
10 tion, Deletion oder Substitution von diesen Sequenzen abge-
leitet sind, hybridisieren und für ein Protein kodieren, das
die biologische Aktivität einer Dihydroorotase besitzt.
3. Protein mit Dihydroorotase-Aktivität, enthaltend eine Amino-
15 säuresequenz, die eine Teilsequenz von mindestens 100 Amino-
säuren aus SEQ-ID NO: 2 darstellt.
4. Protein nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es als
Aminosäuresequenz die Teilsequenz 50 - 300 aus SEQ-ID NO: 2
20 enthält.
5. Protein nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß es als
Aminosäuresequenz die in SEQ-ID NO: 2 dargestellte Sequenz
enthält.
25
6. Verwendung von DNA-Sequenzen nach Anspruch 1 oder 2 zur Ein-
führung in pro- oder eukaryontische Zellen, wobei diese
Sequenzen gegebenenfalls mit Steuerelementen, die die
Transkription und Translation in den Zellen gewährleisten,
30 verknüpft sind und zur Expression einer translatierbaren
mRNA, die die Synthese einer Dihydroorotase bewirkt, führen.
7. Verwendung der DNA-Sequenzen nach Anspruch 1 und 2 zur Her-
stellung eines Testsystems zur Identifizierung von
35 Inhibitoren der Dihydroorotase mit herbizider Wirkung.
8. Verwendung der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 kodierend für eine
Dihydroorotase und der DNA-Sequenz-SEQ ID No. 3 kodierend für
eine Dihydroorotatdehydrogenase zur Herstellung eines Testsys-
40 tems zur Identifizierung von Inhibitoren der Dihydroorotase
mit herbizider Wirkung.
9. Verfahren zum Auffinden von Substanzen, die die Aktivität der
pflanzlichen Dihydroorotase inhibieren, dadurch gekennzeich-
45 net, daß in einem ersten Schritt unter Verwendung einer DNA-
Sequenz nach Anspruch 1 oder 2 Dihydroorotase hergestellt
wird und in einem zweiten Schritt die Aktivität der pflanzli-

chen Dihydroorotase in Anwesenheit einer Testsubstanz gemessen wird.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die
5 Messung der pflanzlichen Dihydroorotase in einem High-Throughput-Screening (HTS) ausgeführt wird.
11. Verfahren zur Identifizierung von Substanzen mit herbizider Wirkung, die die Dihydroorotase Aktivität in Pflanzen hemmen,
10 bestehend aus
- a) der Herstellung von transgenen Pflanzen, Pflanzengeweben, oder Pflanzenzellen, die eine zusätzliche DNA-Sequenz codierend für ein Enzym mit Dihydroorotase Aktivität enthalten und in der Lage sind eine enzymatisch aktive Dihydroorotase überzuexprimieren;
15
- b) das Aufbringen einer Substanz auf transgene Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile sowie auf nicht-transformierte Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile;
20
- c) das Bestimmen des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der transgenen und der nicht-transformierten Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile nach der Aufbringung der chemischen Substanz; und
25
- d) dem Vergleich des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der transgenen und der nicht-transformierten Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile nach der Aufbringung der chemischen Substanz;
30
- wobei die Unterdrückung des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der nicht-transformierten Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile ohne jedoch das Wachstum oder die Überlebensfähigkeit der transgenen Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile stark zu unterdrücken, belegt, daß die Substanz aus b) herbizide Aktivität zeigt und die Enzymaktivität in Pflanzen inhibiert.
35
12. Testsystem basierend auf der Expression einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 nach Anspruch 1 oder 2 zur Identifizierung von Inhibitoren der Dihydroorotase mit herbizider Wirkung.
40

13. Testsystem basierend auf der Expression einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 und einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 3 zur Identifizierung von Inhibitoren der Dihydroorotase mit herbizider Wirkung.
- 5
14. Testsystem gemäß Anspruch 12 oder 13 zur Identifizierung von Inhibitoren pflanzlicher Dihydroorotase, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym mit einem zu untersuchenden Testsubstrat inkubiert und nach einer geeigneten Reaktionszeit die enzymatische Aktivität des Enzyms im Vergleich zur Aktivität des nicht gehemmten Enzyms ermittelt wird.
- 10
15. Inhibitoren pflanzlicher Dihydroorotase.
- 15
16. Inhibitoren pflanzlicher Dihydroorotase, identifiziert unter Verwendung eines Testsystems nach Anspruch 12, 13 oder 14.
17. Inhibitoren, identifiziert nach einem der Ansprüche 15 oder 16 zur Verwendung als Herbizid.
- 20
18. Verfahren zur Beseitigung von unerwünschtem Pflanzenwuchs, dadurch gekennzeichnet, daß die zu beseitigenden Pflanzen mit einer Verbindung behandelt werden, die spezifisch an Dihydroorotase, codiert durch eine DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder 2, bindet und deren Funktion inhibiert.
- 25

30

35

40

45

FIG.1

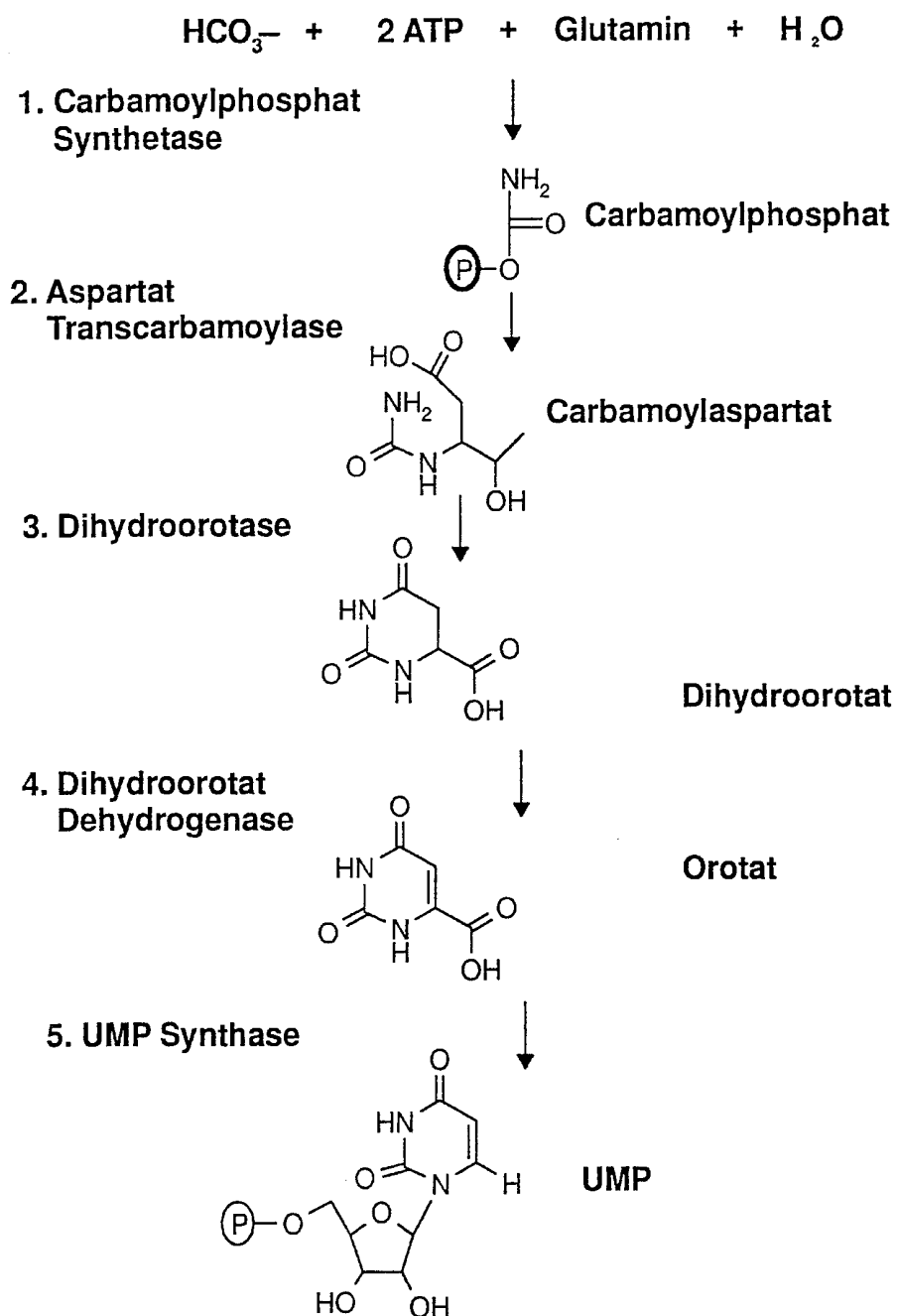


FIG.2

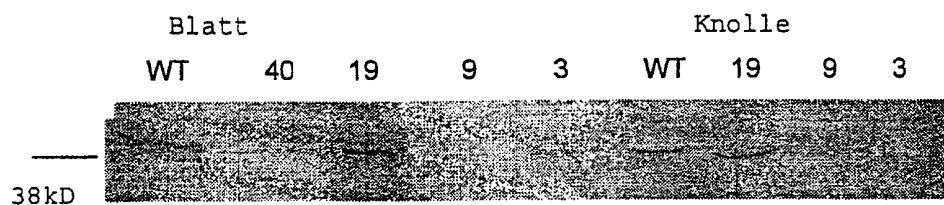
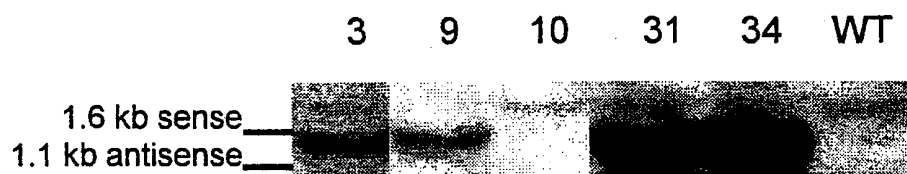


FIG.3



SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> Dihydroorotase aus Pflanzen

<130> O.Z. 0050/50716

<140> DE 199 42 742.9

<141> 1999-09-07

<160> 4

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 1271

<212> DNA

<213> Solanum tuberosum

<220>

<221> CDS

<222> (9)..(1046)

<400> 1

ttgcaaaa atg gag ctc tca atc aca caa cct gat gat tgg cat ctt cat 50

Met Glu Leu Ser Ile Thr Gln Pro Asp Asp Trp His Leu His

1

5

10

ctc cgt gat ggt gat gtt ctt aag gca gtt gtc tct cac agt gca cat 98

Leu Arg Asp Gly Asp Val Leu Lys Ala Val Val Ser His Ser Ala His

15

20

25

30

cac ttt ggg agg gca ata gtc atg cca aat ttg aag cct cct atc act 146

His Phe Gly Arg Ala Ile Val Met Pro Asn Leu Lys Pro Pro Ile Thr

35

40

45

acc act gct gct gct gta gca tac cgg gag gcg ata ttg aaa tct tta 194

Thr Thr Ala Ala Ala Val Ala Tyr Arg Glu Ala Ile Leu Lys Ser Leu

50

55

60

cct gtt gat agt gat ttc aac cct ctt atg aca ctt tat ttg aca gat 242

Pro Val Asp Ser Asp Phe Asn Pro Leu Met Thr Leu Tyr Leu Thr Asp

65

70

75

aca acc agt cct atg gaa atc aaa cta gca aga gag agc cag gtc gta 290

Thr Thr Ser Pro Met Glu Ile Lys Leu Ala Arg Glu Ser Gln Val Val

80

85

90

ttt ggg gtg aag ttg tac cct gct ggt gcc acg aca aat tct caa gat	338
Phe Gly Val Lys Leu Tyr Pro Ala Gly Ala Thr Thr Asn Ser Gln Asp	
95 100 105 110	
gga gtg act gat ctt ttc ggg aag tgt tta cca gtt cta caa gaa atg	386
Gly Val Thr Asp Leu Phe Gly Lys Cys Leu Pro Val Leu Gln Glu Met	
115 120 125	
gtt gag cat aat atg cct ctg ctg gtt cat gga gag gtt act aat cct	434
Val Glu His Asn Met Pro Leu Leu Val His Gly Glu Val Thr Asn Pro	
130 135 140	
gag gtt gac atg ttt gat aga gaa aag gta ttc att gaa acg gtt cta	482
Glu Val Asp Met Phe Asp Arg Glu Lys Val Phe Ile Glu Thr Val Leu	
145 150 155	
aga ccg ttg gtg cag aaa ttt cca caa ttg aag gtc gtg atg gag cat	530
Arg Pro Leu Val Gln Lys Phe Pro Gln Leu Lys Val Val Met Glu His	
160 165 170	
gtt acc acc att gat gct gtt aag ttt gtt gaa tct tgc act gaa gga	578
Val Thr Thr Ile Asp Ala Val Lys Phe Val Glu Ser Cys Thr Glu Gly	
175 180 185 190	
ttt gtt gca gca act gtc acc cca caa cat ctt gtt ttg aac agg aat	626
Phe Val Ala Ala Thr Val Thr Pro Gln His Leu Val Leu Asn Arg Asn	
195 200 205	
tct ctc ttc caa ggg ggc tta caa ccg cat aat tac tgc ctt cca gtc	674
Ser Leu Phe Gln Gly Gly Leu Gln Pro His Asn Tyr Cys Leu Pro Val	
210 215 220	
ctc aaa aga gag atc cac agg gag gca ctt gtg tca gct gta aca agt	722
Leu Lys Arg Glu Ile His Arg Glu Ala Leu Val Ser Ala Val Thr Ser	
225 230 235	
gga agt aaa aga ttt ttt ctt ggg act gat agt gct cct cat gat aga	770
Gly Ser Lys Arg Phe Phe Leu Gly Thr Asp Ser Ala Pro His Asp Arg	
240 245 250	
cga aga aaa gag tgt tct tgt gga tgt gct ggt att tac aat gca cct	818
Arg Arg Lys Glu Cys Ser Cys Gly Cys Ala Gly Ile Tyr Asn Ala Pro	
255 260 265 270	
gta gcc ttg tca gta tat gcg aag gtg ttt gaa aag gaa aat gca ctc	866
Val Ala Leu Ser Val Tyr Ala Lys Val Phe Glu Lys Glu Asn Ala Leu	
275 280 285	

gac aag ctt gaa gca ttc act agc ttc aat gga cca gat ttt tat ggg 914
 Asp Lys Leu Glu Ala Phe Thr Ser Phe Asn Gly Pro Asp Phe Tyr Gly
 290 295 300

ctt cct agg aac aac tca aag att aag ttg agt aag acg cca tgg aag 962
 Leu Pro Arg Asn Asn Ser Lys Ile Lys Leu Ser Lys Thr Pro Trp Lys
 305 310 315

gta ccc gaa tcc ttt tct tat gca tca gga gat att att ccc atg ttt 1010
 Val Pro Glu Ser Phe Ser Tyr Ala Ser Gly Asp Ile Ile Pro Met Phe
 320 325 330

gct ggt gaa atg ctc gac tgg ttg ccg gct cct ctc tgagaatcat 1056
 Ala Gly Glu Met Leu Asp Trp Leu Pro Ala Pro Leu
 335 340 345

ttgtcattct tgtactgtaa tattgtgatt caaccaaaga tatagactgt aggtgtatca 1116

tcttttcttt catgttgatt agatattatc acgatgataa taccctttca gctaataaat 1176

tatggaaaca ataagctttg cacgctcacc aaagtgcctc tgtattctga agttcttaaa 1236

ttgttcgttt gattttgaag atttactgat aaaaa 1271

<210> 2

<211> 346

<212> PRT

<213> Solanum tuberosum

<400> 2

Met Glu Leu Ser Ile Thr Gln Pro Asp Asp Trp His Leu His Leu Arg
 1 5 10 15

Asp Gly Asp Val Leu Lys Ala Val Val Ser His Ser Ala His His Phe
 20 25 30

Gly Arg Ala Ile Val Met Pro Asn Leu Lys Pro Pro Ile Thr Thr Thr
 35 40 45

Ala Ala Ala Val Ala Tyr Arg Glu Ala Ile Leu Lys Ser Leu Pro Val
 50 55 60

Asp Ser Asp Phe Asn Pro Leu Met Thr Leu Tyr Leu Thr Asp Thr Thr
 65 70 75 80

Ser Pro Met Glu Ile Lys Leu Ala Arg Glu Ser Gln Val Val Phe Gly

	85		90		95
Val Lys Leu Tyr Pro Ala Gly Ala Thr Thr Asn Ser Gln Asp Gly Val					
	100		105		110
Thr Asp Leu Phe Gly Lys Cys Leu Pro Val Leu Gln Glu Met Val Glu					
	115		120		125
His Asn Met Pro Leu Leu Val His Gly Glu Val Thr Asn Pro Glu Val					
	130		135		140
Asp Met Phe Asp Arg Glu Lys Val Phe Ile Glu Thr Val Leu Arg Pro					
145		150		155	160
Leu Val Gln Lys Phe Pro Gln Leu Lys Val Val Met Glu His Val Thr					
	165		170		175
Thr Ile Asp Ala Val Lys Phe Val Glu Ser Cys Thr Glu Gly Phe Val					
	180		185		190
Ala Ala Thr Val Thr Pro Gln His Leu Val Leu Asn Arg Asn Ser Leu					
	195		200		205
Phe Gln Gly Gly Leu Gln Pro His Asn Tyr Cys Leu Pro Val Leu Lys					
210		215		220	
Arg Glu Ile His Arg Glu Ala Leu Val Ser Ala Val Thr Ser Gly Ser					
225		230		235	240
Lys Arg Phe Phe Leu Gly Thr Asp Ser Ala Pro His Asp Arg Arg Arg					
	245		250		255
Lys Glu Cys Ser Cys Gly Cys Ala Gly Ile Tyr Asn Ala Pro Val Ala					
	260		265		270
Leu Ser Val Tyr Ala Lys Val Phe Glu Lys Glu Asn Ala Leu Asp Lys					
	275		280		285
Leu Glu Ala Phe Thr Ser Phe Asn Gly Pro Asp Phe Tyr Gly Leu Pro					
	290		295		300
Arg Asn Asn Ser Lys Ile Lys Leu Ser Lys Thr Pro Trp Lys Val Pro					
305		310		315	320
Glu Ser Phe Ser Tyr Ala Ser Gly Asp Ile Ile Pro Met Phe Ala Gly					
	325		330		335
Glu Met Leu Asp Trp Leu Pro Ala Pro Leu					

340

345

<210> 3

<211> 1962

<212> DNA

<213> *Nicotiana tabacum*

<220>

<221> CDS

<222> (305)..(1678)

<400> 3

gaattcggca cgagcacaaa agtagaaagg gttttgctct cccctttcat ctgtgtctca 60

taactgtgct aaaacctctc ccattcttccc tcaagaacaa agccacccca aaacaccacc 120

ttgtacactc ccattgtcgc ttccagtttt gtgccccaaa taaccttttc agtcatttgt 180

atcttagcat caacaacagt tgctgtctct cttttgttcg tccaatatac tgagcatttt 240

ttgagtagta atttgaaggg tttattcagt tgtaaatat ttgatttttg ttttgtttaa 300

gaaa atg aga caa agg gtt gga ttt gca ttg att aga gaa agc ttg tat 349

Met Arg Gln Arg Val Gly Phe Ala Leu Ile Arg Glu Ser Leu Tyr

1

5

10

15

cgt aag cta aaa cca agc tct gtt ccc aga cat tat tgc act tct tct 397

Arg Lys Leu Lys Pro Ser Ser Val Pro Arg His Tyr Cys Thr Ser Ser

20

25

30

tca gct aat gtt cct cct att cct cca cct aag att cct cat tct tct 445

Ser Ala Asn Val Pro Pro Ile Pro Pro Pro Lys Ile Pro His Ser Ser

35

40

45

aaa aag gga agg ttg ttt aca gga gcc act att ggt cta cta ata gct 493

Lys Lys Gly Arg Leu Phe Thr Gly Ala Thr Ile Gly Leu Leu Ile Ala

50

55

60

ggg gga gct tat gca agt acg gtt gat gag gcc acc ttc tgt ggc tgg 541

Gly Gly Ala Tyr Ala Ser Thr Val Asp Glu Ala Thr Phe Cys Gly Trp

65

70

75

cta ttc tca gca aca aaa cta gta aat ccg ttc ttt gca ttt ctg gat 589

Leu Phe Ser Ala Thr Lys Leu Val Asn Pro Phe Phe Ala Phe Leu Asp

80

85

90

95

cca gag gtt gct cac aaa ctg gcg gtc tct gct gca gcc cga gga tgg 637

Pro	Glu	Val	Ala	His	Lys	Leu	Ala	Val	Ser	Ala	Ala	Ala	Arg	Gly	Trp	
				100					105					110		
gtt	cca	agg	gag	aag	agg	cca	gat	cct	cct	ata	ttg	ggc	ctt	gat	gtg	685
Val	Pro	Arg	Glu	Lys	Arg	Pro	Asp	Pro	Pro	Ile	Leu	Gly	Leu	Asp	Val	
			115					120					125			
tgg	gga	aga	agg	ttc	tca	aat	cct	gtt	ggg	ctt	gct	gct	ggg	ttt	gac	733
Trp	Gly	Arg	Arg	Phe	Ser	Asn	Pro	Val	Gly	Leu	Ala	Ala	Gly	Phe	Asp	
		130					135				140					
aag	aat	gct	gag	gct	gtt	gaa	gga	ttg	ctt	gga	tta	ggg	ttt	ggc	ttt	781
Lys	Asn	Ala	Glu	Ala	Val	Glu	Gly	Leu	Leu	Gly	Leu	Gly	Phe	Gly	Phe	
	145					150				155						
gtt	gag	gtt	ggc	tca	gta	act	ccc	att	cca	cag	gaa	ggc	aac	cca	aaa	829
Val	Glu	Val	Gly	Ser	Val	Thr	Pro	Ile	Pro	Gln	Glu	Gly	Asn	Pro	Lys	
160				165					170					175		
cca	cgt	ata	ttt	agg	ttg	cca	aat	gaa	ggg	gct	ata	ata	aat	agg	tgt	877
Pro	Arg	Ile	Phe	Arg	Leu	Pro	Asn	Glu	Gly	Ala	Ile	Ile	Asn	Arg	Cys	
			180					185					190			
ggc	ttc	aat	agt	gaa	gga	atc	gtt	gtg	gtt	gcc	aaa	cga	ttg	ggg	gct	925
Gly	Phe	Asn	Ser	Glu	Gly	Ile	Val	Val	Val	Ala	Lys	Arg	Leu	Gly	Ala	
		195				200				205						
cag	cat	ggg	aag	aga	aag	ttg	gaa	aca	tct	agt	act	tca	tct	cca	gct	973
Gln	His	Gly	Lys	Arg	Lys	Leu	Glu	Thr	Ser	Ser	Thr	Ser	Ser	Pro	Ala	
	210					215				220						
gga	gat	gaa	gtc	aag	cat	gga	ggg	aaa	gct	ggg	cct	ggg	att	ctt	ggg	1021
Gly	Asp	Glu	Val	Lys	His	Gly	Gly	Lys	Ala	Gly	Pro	Gly	Ile	Leu	Gly	
	225					230			235							
gtt	aac	ctt	gga	aag	aat	aaa	aca	agt	gaa	gac	gct	gca	gca	gat	tat	1069
Val	Asn	Leu	Gly	Lys	Asn	Lys	Thr	Ser	Glu	Asp	Ala	Ala	Ala	Asp	Tyr	
240				245				250						255		
gtg	caa	gga	gtc	cat	aca	tta	tct	cag	tat	gct	gac	tac	ttg	gta	att	1117
Val	Gln	Gly	Val	His	Thr	Leu	Ser	Gln	Tyr	Ala	Asp	Tyr	Leu	Val	Ile	
			260					265					270			
aat	atc	tca	tcc	cca	aat	act	cca	gga	cta	cgc	cag	ctt	cag	gga	aga	1165
Asn	Ile	Ser	Ser	Pro	Asn	Thr	Pro	Gly	Leu	Arg	Gln	Leu	Gln	Gly	Arg	
		275						280				285				
aag	cag	ttg	aag	gat	ctt	gtg	aag	aag	gtt	caa	gca	gct	cgt	gat	gaa	1213

Lys Gln Leu Lys Asp Leu Val Lys Lys Val Gln Ala Ala Arg Asp Glu
 290 295 300

 atg cag tgg ggt gag gaa gga cct ccg cct tta ctt gtg aaa att gct 1261
 Met Gln Trp Gly Glu Glu Gly Pro Pro Pro Leu Leu Val Lys Ile Ala
 305 310 315

 cca gat ttg tct aaa caa gat ctt gaa gat att gca gtg gtg gct gtt 1309
 Pro Asp Leu Ser Lys Gln Asp Leu Glu Asp Ile Ala Val Val Ala Val
 320 325 330 335

 gct ctt cgt gtg gat gga ctg att ata tca aat act act gtc caa aga 1357
 Ala Leu Arg Val Asp Gly Leu Ile Ile Ser Asn Thr Thr Val Gln Arg
 340 345 350

 cca gat tcc ata agt caa aac cct gtg gct caa gag gct ggt ggc ttg 1405
 Pro Asp Ser Ile Ser Gln Asn Pro Val Ala Gln Glu Ala Gly Gly Leu
 355 360 365

 agt ggg aag cca ctc ttt gac atg tca aca aat ata ctg aag gag atg 1453
 Ser Gly Lys Pro Leu Phe Asp Met Ser Thr Asn Ile Leu Lys Glu Met
 370 375 380

 tac gtt ctg act aag gga agg att cct ctg att ggc act ggg ggt att 1501
 Tyr Val Leu Thr Lys Gly Arg Ile Pro Leu Ile Gly Thr Gly Gly Ile
 385 390 395

 agc agt ggc gag gat gct tac aag aaa att cga gct ggt gcc act ctt 1549
 Ser Ser Gly Glu Asp Ala Tyr Lys Lys Ile Arg Ala Gly Ala Thr Leu
 400 405 410 415

 gtt cag ctt tat aca gca ttt gca tat gga ggc cct gca ctt atc ccc 1597
 Val Gln Leu Tyr Thr Ala Phe Ala Tyr Gly Gly Pro Ala Leu Ile Pro
 420 425 430

 gat ata aag gat gaa ctt gct cgt tgc tta gaa aag gat ggt tat aag 1645
 Asp Ile Lys Asp Glu Leu Ala Arg Cys Leu Glu Lys Asp Gly Tyr Lys
 435 440 445

 tca atc agt gag gct gtt gga gca gac tgc aga tagtagtagt tgatatacta 1698
 Ser Ile Ser Glu Ala Val Gly Ala Asp Cys Arg
 450 455

 aaccagtctt ttgagtttga ggggcagagc acatttttgc cacttataat aaatgatata 1758

 tttatgggttt cctcccatgt ggcgtcatat catttgcttc gtaatttgtg atgtcttccc 1818

 aaatttttagc tgtttaggga ttactcgtgg caggtgaccc gtatttttga aatgtaatat 1878

aggaacgaaa ctttgtatgt ttggttgagt tttttcttga tatggaatta aatccacaca 1938

aaaaaaaaaa aaaaaaaaga attc

1962

<210> 4

<211> 458

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<400> 4

Met Arg Gln Arg Val Gly Phe Ala Leu Ile Arg Glu Ser Leu Tyr Arg

1

5

10

15

Lys Leu Lys Pro Ser Ser Val Pro Arg His Tyr Cys Thr Ser Ser Ser

20

25

30

Ala Asn Val Pro Pro Ile Pro Pro Pro Lys Ile Pro His Ser Ser Lys

35

40

45

Lys Gly Arg Leu Phe Thr Gly Ala Thr Ile Gly Leu Leu Ile Ala Gly

50

55

60

Gly Ala Tyr Ala Ser Thr Val Asp Glu Ala Thr Phe Cys Gly Trp Leu

65

70

75

80

Phe Ser Ala Thr Lys Leu Val Asn Pro Phe Phe Ala Phe Leu Asp Pro

85

90

95

Glu Val Ala His Lys Leu Ala Val Ser Ala Ala Ala Arg Gly Trp Val

100

105

110

Pro Arg Glu Lys Arg Pro Asp Pro Pro Ile Leu Gly Leu Asp Val Trp

115

120

125

Gly Arg Arg Phe Ser Asn Pro Val Gly Leu Ala Ala Gly Phe Asp Lys

130

135

140

Asn Ala Glu Ala Val Glu Gly Leu Leu Gly Leu Gly Phe Gly Phe Val

145

150

155

160

Glu Val Gly Ser Val Thr Pro Ile Pro Gln Glu Gly Asn Pro Lys Pro

165

170

175

Arg Ile Phe Arg Leu Pro Asn Glu Gly Ala Ile Ile Asn Arg Cys Gly

180

185

190

Phe Asn Ser Glu Gly Ile Val Val Val Ala Lys Arg Leu Gly Ala Gln
 195 200 205

His Gly Lys Arg Lys Leu Glu Thr Ser Ser Thr Ser Ser Pro Ala Gly
 210 215 220

Asp Glu Val Lys His Gly Gly Lys Ala Gly Pro Gly Ile Leu Gly Val
 225 230 235 240

Asn Leu Gly Lys Asn Lys Thr Ser Glu Asp Ala Ala Ala Asp Tyr Val
 245 250 255

Gln Gly Val His Thr Leu Ser Gln Tyr Ala Asp Tyr Leu Val Ile Asn
 260 265 270

Ile Ser Ser Pro Asn Thr Pro Gly Leu Arg Gln Leu Gln Gly Arg Lys
 275 280 285

Gln Leu Lys Asp Leu Val Lys Lys Val Gln Ala Ala Arg Asp Glu Met
 290 295 300

Gln Trp Gly Glu Glu Gly Pro Pro Pro Leu Leu Val Lys Ile Ala Pro
 305 310 315 320

Asp Leu Ser Lys Gln Asp Leu Glu Asp Ile Ala Val Val Ala Val Ala
 325 330 335

Leu Arg Val Asp Gly Leu Ile Ile Ser Asn Thr Thr Val Gln Arg Pro
 340 345 350

Asp Ser Ile Ser Gln Asn Pro Val Ala Gln Glu Ala Gly Gly Leu Ser
 355 360 365

Gly Lys Pro Leu Phe Asp Met Ser Thr Asn Ile Leu Lys Glu Met Tyr
 370 375 380

Val Leu Thr Lys Gly Arg Ile Pro Leu Ile Gly Thr Gly Gly Ile Ser
 385 390 395 400

Ser Gly Glu Asp Ala Tyr Lys Lys Ile Arg Ala Gly Ala Thr Leu Val
 405 410 415

Gln Leu Tyr Thr Ala Phe Ala Tyr Gly Gly Pro Ala Leu Ile Pro Asp
 420 425 430

Ile Lys Asp Glu Leu Ala Arg Cys Leu Glu Lys Asp Gly Tyr Lys Ser
 435 440 445

Ile Ser Glu Ala Val Gly Ala Asp Cys Arg
450 455