

(12) Ausschließungspatent

(11) DD 284 048 A5



Erteilt gemäß § 17 Absatz 1  
Patentgesetz der DDR  
vom 27. 10. 1983  
in Übereinstimmung mit den entsprechenden  
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 N 15/82  
C 12 N 15/55

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

---

(21)	DD C 12 N / 330 727 7	(22)	08.07.88	(44)	31.10.90
(31)	071146	(32)	08.07.87	(33)	US

---

(71) siehe (73)  
(72) Stalker, David, US  
(73) RHONE-POULENC AGROCHIMIE, 69009 Lyon, 14-20, rue Pierre Baizet, FR  
(74) Patentanwaltsbüro Berlin, Frankfurter Allee 286, Berlin, 1130, DD

---

(54) Verfahren zur Herstellung einer Pflanzenzelle bzw. eines Pflanzenteils oder einer Pflanze mit einer derartigen Pflanzenzelle

---

(55) Verfahren; Herstellung; Pflanzenzelle; 3,5-dihalogenierte p-Hydroxybenzonnitrile; hydrolysieren; funktionell Expressionskassette; Gen; Nitrilase; Bakterien; Bromoxynitril

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer Pflanzenzelle bzw. eines Pflanzenteils oder einer Pflanze mit einer derartigen Pflanzenzelle, die 3,5-dihalogenierte p-Hydroxybenzonnitrile hydrolysieren. Dadurch wird es möglich, die herbizide Wirkung der Nitrile zu verhindern. Die erfindungsgemäß hergestellte Pflanzenzelle ist gekennzeichnet durch eine funktionelle Expressionskassette mit in Transkriptionsrichtung einer Transkriptions- und Translations-Start-Regulatorregion und einem Gen, das eine Nitrilase aus Bakterien mit etwa 34 kDal codiert, die im wesentlichen für 3,5-dihalogeniertes p-hydroxybenzonnitril spezifisch ist und eine spezifische Aktivität von mindestens etwa 0,1  $\mu\text{mol NH}_3/\text{min}/\text{mg}$  Protein mit Bromoxynil als Substrat aufweist und durch mindestens eine Substitution, Abspaltung oder Extension von insgesamt nicht mehr als 50 Aminosäuren modifiziert worden ist.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer Pflanzenzelle bzw. eines Pflanzenteils oder einer Pflanze mit einer derartigen Pflanzenzelle, gekennzeichnet durch Einführen in die Pflanzenzelle, den Pflanzenteil oder die Pflanze eines Gens, das eine Nitrilase aus Bakterien mit etwa 34 kDal codiert, die im wesentlichen für 3,5-dihalogeniertes p-Hydroxybenzonnitril spezifisch ist und eine spezifische Aktivität von mindestens etwa 0,1  $\mu\text{mol NH}_3/\text{min}/\text{mg}$  Protein mit Bromoxynil als Substrat aufweist und durch mindestens eine Substitution, Abspaltung oder Extension von insgesamt nicht mehr als 50 Aminosäuren modifiziert worden ist, wobei das Gen Teil einer funktionellen Expressionskassette mit in Transkriptionsrichtung einer Transkriptions- und Translations-Start-Regulatorregion ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch Verwendung einer Expressionskassette, die außerdem den rechten Rand der T-DNA enthält.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, gekennzeichnet durch Verwendung einer Expressionskassette, in der die Transkriptions- und Translations-Start-Regulatorregion die Regulatorregion für die Transkription eines Opins ist.

Verfahren zur Herstellung einer Pflanzenzelle bzw. eines Pflanzenteils oder einer Pflanze mit einer derartigen Pflanzenzelle

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer Pflanzenzelle bzw. eines Pflanzenteiles oder einer Pflanze mit einer derartigen Pflanzenzelle.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die Bromoxynil- und/oder Ioxynil-spezifischen Nitralase können zur Entgiftung von mit Bromoxynil und verwandten Herbiziden verunreinigten Stellen und zum Schutz von Wirtzellen vor der zytotoxischen Wirkung dieser Herbizide verwendet werden. Die Konstruktionen können zur Unterscheidung von diesen Strukturen enthaltenden Wirtzellen und Wirtzellen, die diese Konstruktionen nicht enthalten, verwendet werden.

Die Möglichkeit, Mikroorganismen und Zellen höherer Organismen neue genetische Fähigkeiten zu verleihen, hat eine Vielzahl von neuen Anwendungsgebieten eröffnet. Eines dieser Gebiete betrifft verschiedene Mittel, die wegen ihrer zytotoxischen Wirkung verwendet werden, wie beispielsweise viele Verbindungen, die in der Landwirtschaft zur Schädlingsbekämpfung und/oder Unkrautvernichtung eingesetzt werden. In vielen Fällen haben diese Verbindungen eine relativ lange Verweilzeit oder hinterlassen einen beträchtlichen Rückstand.

In vielen Fällen ist es erwünscht, zwischen zu erhaltenden Arten und solchen, die vertilgt werden müssen, zu unterscheiden. So ist es oft erwünscht, Unkraut selektiv zu vernichten, wobei die Ernte möglichst wenig beeinträchtigt werden sollte. In den meisten Fällen haben viele der Breitband-Herbizide einen sehr nachteiligen Einfluß auf die Ernte, so daß ihre Verwendung auf eine Voremergenz- oder vorsichtige Postemergen-Anwendung begrenzt ist.

Es bestand daher großes Interesse, lebende Zellen so verändern zu können, daß sie gegenüber Beanspruchungen, wie durch zytotoxische Mittel, widerstandsfähig sind.

In der US-PS 4 535 060 wird die Verwendung eines bakteriellen *aroA*-Gens beschrieben, das glyphosatempfindlichen Zellen Glyphosat-Resistenz verleiht. Hsu und Camper, "Can. J. Microbiol.", 22, S. 537-543 (1976) beschreiben die Isolierung von Ioxynil-"Abbauern" aus mit Erde angereicherten Kulturen. Hsu und Clemson, "Dissert. Abstr. Intrn.", B36, Nr. 8, S. 3708 (1976) beschreiben den mikrobiellen Abbau einer Familie von 3,5-Dihalogen-4-hydroxybenzonnitril-Herbiziden. Ingram und Pullin, "Pestic. Sci.", 5, S. 287-291 (1974) beschreiben den längeren Verbleib von Bromoxynil in drei Bodenarten. Smith, "Abstr. Meeting Wood Soc. Am." (1971), S. 16-17 beschreibt den Abbau von Bromoxynil in schwerem Ton (Regina heavy clay). Smith und Flether, "Hort. Res.", 4, S. 60-62 (1964) berichten von 3,5-Dihalogen-4-hydroxybenzonnitrilen und Bodenorganismen.

#### Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Herstellung neuer Pflanzenzellen bzw. von diese Zellen enthaltenden Pflanzenteilen oder Pflanzen bereitzustellen, die 3,5-dihalogenierte *p*-Hydroxybenzonnitrile und insbesondere 3,5-Dibrom- oder 3,5-Dijod-4-hydroxybenzonnitril hydrolisieren. Dadurch wird es im Endeffekt möglich, die herbizide Wirkung des Nitrils zu verhindern. Die erfindungsgemäß hergestellten Pflanzenteile

oder -zellen sollen also gegenüber dem Herbizid geschützt sein.

#### Darlegung des Wesens der Erfindung

Erfindungsgemäß ist das Verfahren gekennzeichnet durch Einführen eines Gens in die Pflanzenzelle, den Pflanzenteil oder die Pflanze, wobei das Gen eine Nitrilase aus Bakterien mit etwa 34 kDal codiert, die im wesentlichen für 3,5-dihalogeniertes p-Hydroxybenzonnitril spezifisch ist und eine spezifische Aktivität von mindestens etwa  $0,1 \mu\text{mol NH}_3/\text{min/mg}$  Protein mit Bromoxynil als Substrat aufweist und durch mindestens eine Substitution, Abspaltung oder Extension von insgesamt nicht mehr als 50 Aminosäuren modifiziert worden ist, wobei das Gen ferner Teil einer funktionellen Expressionskassette mit in Transkriptionsrichtung einer Transkriptions- und Translations-Start-Regulatorregion ist.

Zweckmäßig wird eine Expressionskassette verwendet, die außerdem den rechten Rand der T-DNA enthält.

Weiterhin ist es vorteilhaft, eine Expressionskassette, in der die Transkriptions- und Translations-Start-Regulatorregion die Regulatorregion für die Transkription eines Opins ist, zu verwenden.

Bei den Bakterien sind Enterobakterien von Interesse und insbesondere die Art *Klebsiella*. *Klebsiella pneumoniae* und insbesondere die Art *oceanae* kann eingesetzt werden. Besser als sie aus dem Boden zu isolieren, werden die Organismen im Boden oder anderen Medien mit höher werdenden Konzentrationen an 3,5-dihalogeniertem p-Hydroxybenzonnitril und verminderten Mengen an anderen Stickstoff-

quellen gezüchtet, bis überlebende Organismen erhalten werden, die Benzonitril als einzige Stickstoffquelle verwenden.

Unabhängig von den die Nitrilase enthaltenden Bakterien muß selektioniert werden, um zu gewährleisten, daß die Nitrilase bei der Entgiftung des 3,5-dihalogeniertem p-Hydroxybenzonitrils wirksam ist. Zusätzlich sollte die Nitrilase für dieses Hydroxybenzonitril eher als für analoge Verbindungen, denen die Halogen- oder andere Substituenten fehlen, spezifisch sein. Die erfindungsgemäße Nitrilase ist daher für die erwähnten Hydroxybenzonitrile, wie angegeben, spezifisch, und relativ inaktiv oder wesentlich weniger aktiv für analoge Verbindungen.

Zweckmäßigerweise sollte bei Kultivierung mit 3,5-dihalogeniertem p-Hydroxybenzonitril als Stickstoffquelle bei vergleichbaren Konzentrationen die Proliferationsgeschwindigkeit nicht deutlich niedriger sein, d.h. nicht mehr als 10 % vermindert, als die Proliferationsgeschwindigkeit des Bakteriums in Gegenwart einer

normalen Stickstoffquelle, wie beispielsweise Ammoniak. Dieses Ergebnis wird mit nichtspezifischen Benzonitrilen nicht beobachtet.

Sind der oder die Wirtstamm oder Wirtstämme einmal identifiziert, so können verschiedene Verfahren zur Identifizierung der Codiersequenz der Nitrilase eingesetzt werden. Das Gen kann auf einem Chromosom oder einem Plasmid vorhanden sein. Das Genom wird fragmentiert, insbesondere mit einer Restriktionsendonuklease, wobei eine oder mehrere Endonukleasen eingesetzt werden können, um Fragmente von etwa 5 bis 50 KB herzustellen. Diese Fragmente können auf entsprechenden Vektoren in einem geeigneten Bakterium, wie *E. coli*, kloniert werden, die entstandenen Transformanten werden auf Nitrilaseaktivität selektioniert, wobei der Wirtorganismus einen negativen Hintergrund abgibt.

Steht fest, daß ein oder mehrere Klone Nitrilaseaktivität aufweisen, so können die das gewünschte DNA-Fragment enthaltende extrachromosomalen Elemente, Plasmide oder Viren in herkömmlicher Weise isoliert werden, z.B. durch Lyse des Wirts, Ausfällen der DNA und Abtrennen der Vektor-DNA, Plasmid- oder Virus-DNA von der chromosomalen DNA. Die extrachromosomalen Elemente können durch Restriktionsendonukleasen gespalten werden, die gewünschten Fragmente können durch verschiedene Verfahren zur Trennung und Identifizierung der Fragmente verschiedener Größe, wie Elektrophorese oder Dichtegradienten-Zentrifugieren, isoliert werden.

Das Fragment wird je nach Größe weiter manipuliert, um es an die Größe des Gens und seiner flankierenden Regulatorregionen anzupassen. Es gibt verschiedene Verfahren zur Manipulation des Fragments, das die für das Enzym codierende Sequenz und ihre flankierenden Regulatorsequenzen enthält, beispielsweise Teilspaltung mit verschiedenen Restriktionsenzymen in verschiedenen Reaktionsgemischen und anschließendes Klonen der Fragmente zur Bestimmung, in welchen Fragmenten die Fähigkeit zur Expression der Nitri-lase zurückbleibt.

Das Enzym kann aber auch isoliert und teilsequenziert werden. Auf der Basis der Aminosäuresequenz können Sonden hergestellt werden, die zur Identifizierung der das Gen enthaltenden Fragmente verwendet werden können. Durch Kombinieren dieser Annäherung mit der Spaltung mit Restriktionsenzymen können Fragmente geklont und auf die Anwesenheit des gewünschten Gens selektioniert werden. Außerdem können Exonukleasen, wie Bal31, verwendet werden, um die Nukleotide an einem oder beiden Enden des Fragments zu entfernen und die Anzahl der überflüssigen Nukleotide weiter zu verringern.

Alternativ kann das Gen in einem geeigneten Wirt geklont und die Boten-RNA (mRNA) durch Selektionieren mit einer Sonde, Identifizieren in einem entsprechenden in vitro- oder in vivo-Translationssystem, beispielsweise *Xenopus* oocytes oder Reticulolysat, isoliert werden. Die isolierte mRNA kann dann zur Herstellung von cDNA unter Einsatz herkömmlicher Verfahren, wie reverse Transkriptase und

Bildung der Komplementärkette mit DNA-Polymerase, verwendet werden. In diesem Fall fehlen dem entstandenen Strukturgen die an die Transkription gebundenen Regulatorregionen.

Das Nitrilasegen kann auf verschiedene Weise modifiziert werden, entweder durch Verkürzen oder Verlängern eines oder beide der 5'- und/oder 3'-Enden. Im allgemeinen sind nicht mehr als 25, insbesondere nicht über etwa 20 Codons an der natürlich vorkommenden Nitrilase beteiligt. Die Nitrilase kann um bis zu 50 Aminosäuren, im allgemeinen nicht über etwa 30 Aminosäuren, verlängert werden. Kombinationen von Substitution, Abspaltung und Extension können eingesetzt werden. D.h., das Gen kann auf verschiedene Weisen manipuliert werden, um beispielsweise die Eigenschaften des Enzyms zu ändern oder es für Manipulationen der Plasmide geeigneter zu machen.

Die DNA-Sequenz, die das die Nitrilase exprimierende Strukturgen enthält, kann an viele andere DNA-Sequenzen zur Einführung in eine entsprechende Wirtszelle gebunden werden. Die Begleitsequenz hängt von der Art des Wirts, der Einführungsweise der DNA-Sequenz in den Wirt und davon ab, ob episodale Aufrechterhaltung oder Integration erwünscht ist.

Für prokaryontische Wirte gibt es viele Vektoren, die zur Einführung durch Transformation, Konjugation, Transduktion oder Transfektion der DNA-Sequenz in einen prokaryontischen Wirt verwendet werden können. DNA-Sequenzen umfassen eine Vielzahl von Plasmiden, wie pBR322, pACYC184, pMB9 oder pRK290, Cosmide, wie pVK100 oder Viren, wie P22.

Für eukaryontische Zellen können verschiedene Verfahren zur Einführung der DNA in den Wirt eingesetzt werden, wie Transformation mit  $\text{Ca}^{++}$ -ausgefällter DNA, wobei eine nicht-replikative DNA-Sequenz, ein Plasmid oder ein Minichromosom beteiligt sind, Transformation mit einer T-DNA enthaltenden Sequenz in Agrobakterium, Mikroinjektion mit einer Mikropipette oder Elektroporation. Es hängt davon ab, ob ein kompetentes Replikationssystem in der DNA-Konstruktion vorhanden ist, ob die DNA als episomales Element repliziert oder in das Wirtgenom integriert und das Strukturgen im Wirt exprimiert wird. Es können episomale Elemente, wie tumorinduzierende Plasmide, beispielsweise Ti oder Ri, oder ihre Fragmente, oder Viren, wie CaMV oder TMV, oder ihre Fragmente verwendet werden, die für den Wirt nicht tödlich sind und in denen das Strukturgen in solchen episomalen Elementen vorhanden ist, daß es die Expression des Strukturgens ermöglicht. Von besonderem Interesse sind Fragmente mit Replikationsfunktion, denen andere Funktionen, wie Onkogenese oder Virulenz fehlen.

Die aus der Nitrilase erhaltenen Fragmente können unter Verwendung eines geeigneten Klonierungsvektor geklont werden. Das Klonen kann in einem geeigneten einzelligen Mikroorganismus, beispielsweise einem Bakterium, wie *E. coli*, durchgeführt werden. Zweckmäßigerweise wird ein Cosmid verwendet, wobei durch Teil- oder Vollspaltung Fragmente mit der gewünschten Größe entstehen. Beispielsweise kann das Cosmid pVK100 mit einem geeigneten Restriktionsenzym teilgespalten und an Fragmente gebunden werden, die entwe-

der durch Teil- oder Vollspaltung eines Plasmids, Chromosoms oder deren Fragment entstanden sind. Durch Verpackung wird gewährleistet, daß nur Fragmente der gewünschten Größe verpackt und in den Wirt-Organismus transduziert werden.

Der Wirt-Organismus wird anhand der Benzonitril-Resistenz ausgewählt. Die aufnehmenden Stämme können so verändert werden, daß sie geeignete genetische Merkmale aufweisen, die die Selektion von Transduktanten ermöglichen. Bei Mikroorganismen können die Transduktanten zur Konjugation mit anderen Mikroorganismen unter Verwendung, bei Bedarf, eines mobilisierenden Plasmids eingesetzt werden. Zur weiteren Verminderung der Größe des das Strukturgen für die Nitrilase enthaltenden Fragments können verschiedene Verfahren eingesetzt werden. So kann beispielsweise der Cosmidvektor isoliert, mit einer Vielzahl von Restriktionsendonukleasen, wie EcoRI, BglII oder SmaI, gespalten werden und die entstandenen Fragmente in einen entsprechenden Vektor, zweckmäßigerweise in den vorher verwendeten Cosmidvektor, geklont werden. Anstelle eines Cosmidvektors stehen viele Klonierungsvektoren geringer Größe, wie pACYC177 und pACYC184, zur Verfügung. D.h., Fragmente von vorzugsweise unter etwa 5 KB, im allgemeinen unter etwa 4 KB und insbesondere unter etwa 2 KB, können geklont werden und gewähren Benzonitrilresistenz.

Zweckmäßigerweise enthält das Fragment etwa 1 KB und unter etwa 5 KB, vorzugsweise unter etwa 4 KB, insbesondere mindestens etwa 1047 Basenpaare (BP), insbesondere einschließlich der flankierenden Regionen mindestens etwa 1100

BP, vorzugsweise unter etwa 1,5 KB. Von besonderem Interesse ist ein BglIII-SmaI-Fragment aus *Klebsiella ozaenae* und insbesondere ein PstI-HincII-Fragment mit etwa 1210 BP.

Von besonderem Interesse ist eine Verkürzung des Nitrilasegens bis zu etwa 5 Codons am 5'-Ende und bis etwa 10 Codons am 3'-Ende oder das Zufügen bis zu etwa 50, im allgemeinen nicht über etwa 30 und vorzugsweise nicht über 20 Codons am 5'- und/oder 3'-Ende. D.h., das entstandene Enzym kann vom natürlich vorkommenden Enzym durch bis zu 50 Aminosäuren, im allgemeinen nicht über etwa 30 Aminosäuren und vorzugsweise nicht über etwa 25 Aminosäuren verschieden sein, wobei eine Kombination von Substitution, Extension und Abspaltung durchgeführt wird.

Die Nitrilase kann in jeder geeigneten Quelle, entweder in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen, wie Bakterien, Hefe, Schlauchpilzen oder Pflanzenzellen, exprimiert werden. Wo keine Sekretion erhalten wird, kann das Enzym durch Lyse der Zellen in bekannter Weise isoliert werden. Geeignet sind beispielsweise die Chromatographie, Elektrophorese oder Affinitätschromatographie. Zweckmäßigerweise wird Bromoxynil über eine entsprechende funktionelle Gruppe, wie die Carboxyl-Gruppe, an einen unlöslichen Träger gebunden und als Verpackung für die Isolierung der Nitrilase verwendet.

Die spezifische Nitrilaseaktivität beträgt mindestens etwa 0,1  $\mu\text{mol}$  Ammoniak/min/mg Protein, im allgemeinen mindestens etwa 0,5 oder mehr  $\mu\text{mol}$  Ammoniak/min/mg Protein

unter Bedingungen, wie sie von Harper, "Biochem. J.", 167, S. 685-692 (1977) beschrieben werden.

Das gereinigte Enzym kann in vielerlei Weisen verwendet werden: es kann beispielsweise direkt in Untersuchungen auf Bromoxynil, Ioxynil oder andere verwandte Benzonitrile verwendet werden. Es kann aber auch als Nachweis in diagnostischen Versuchen dienen, z.B. dadurch, daß es an eine zu untersuchende Substanz, wie ein Hapten oder Antigen, oder einen Antikörper, gebunden wird. Diese Versuche sind in den US-PS 3 654 090, 3 817 837 und 3 850 752 beschrieben, in denen die Konjugation sowie die Bestimmung der Konzentration der zu untersuchenden Substanz eingehend erläutert sind (die entsprechenden Teile dieser Beschreibungen sind hier miteinbezogen).

Die die Nitrilase codierende DNA-Sequenz kann in verschiedenen Weisen verwendet werden, beispielsweise zur Isolierung des Wildtyps oder von Nitrilase-Mutanten.

Sie kann aber auch zur Integration durch Rekombination in einen Wirt eingesetzt werden, wobei dem Wirt Benzonitrilresistenz verliehen wird.

Bei Pflanzenzellen kann das Strukturgen als Teil einer Konstruktion in einen Pflanzenzellkern durch Mikropipetteninjektion zur Integration durch Rekombination in das Wirtgenom eingeführt werden. Alternativ kann auch die Elektroporation zur Einführung des Strukturgens in eine Pflanzenwirtszelle verwendet werden. Wurde das Strukturgen aus einer

Quelle mit Regulatorsignalen erhalten, die von dem Pflanzenwirt nicht erkannt werden, so müssen die entsprechenden Regulatorsignale für die Expression eingeführt werden. Wird ein Virus oder Plasmid, beispielsweise ein tumorinduzierendes Plasmid, verwendet, das kartiert worden ist, so kann eine Schnittstelle gewählt werden, die stromabwärts von einem Promotor liegt und in die das Strukturgen in einer entsprechenden Entfernung vom Promotor eingefügt werden kann. Weisen die DNA-Sequenzen keine geeignete Schnittstelle auf, so können sie mehrmals mit einer Exonuklease, wie Bal31, gespalten und eine synthetische Endonukleaseschnittstelle (Linker) eingeführt werden.

Von besonderem Interesse ist die Verwendung eines tumorinduzierenden Plasmids, z.B. Ti oder Ri, mit dem das Nitrilasegen in Pflanzenzellchromosomen eingeführt werden kann. Die Verwendung von Ti- und Ri-Plasmiden ist in PCT-A-WO84/02913, 02919 und 02920 sowie EP-A-0 116 718 sowie bei Matzke und Chilton "J. Mol. App. Genetics", 1, S. 39-49 (1981) beschrieben.

Durch Verwendung des rechten Rands oder beider Ränder der T-DNA, d.h. der Ränder, die eine Expressionskassette flankieren, die das Nitrilase-Strukturgen und die Transkriptions- und Translations-Regulatorsignale für den Start (Initiation) und das Ende (Termination) umfassen und die vom Pflanzenwirt erkannt werden, kann die Expressionskassette in das Pflanzengenom integriert werden und die Expression der Nitrilase in der Pflanzenzelle bei verschiedenen Differenzierungsstufen ermöglicht werden.

Verschiedene Konstruktionen können für die Expression in Pflanzenzellen hergestellt werden. Dabei wird eine Expressionskassette zur Verfügung gestellt, die in Pflanzen zur Expression der Nitrilase im Pflanzenwirt funktionell ist.

Für die Transkription können viele Transkriptionsstartregionen (Promotorregionen), entweder konstitutive oder induzierbare, eingesetzt werden.

Die Transkriptionsstartregion ist an das die Nitrilase codierende Strukturgen gebunden und gewährleistet die Transkriptionsinitiation stromaufwärts vom Initiationscodon, normalerweise innerhalb etwa 200 Basen des Initiationscodons, dort, wo der nicht übersetzten (nicht translatierten) 5'-Region ein ATG fehlt.

Das 3'-Ende des Strukturgens hat ein oder mehrere Stopcodons, die an eine Transkriptionsendregion, die in einem Pflanzenwirt funktionell ist, gebunden sind, wobei die Endregion mit dem gleichen oder verschiedenen Strukturgenen wie die Startregion verbunden ist.

Die Expressionskassette ist dadurch gekennzeichnet, daß sie in Richtung der Transkription der Startregion das Strukturgen unter der Transkriptionskontrolle der Startregion und der Endregion für die Beendigung der Transkription und die Herstellung der m-RNA, wenn es angebracht ist, enthält.

Als Transkriptions- und Translations-Regulatorregionen kön-

nen zweckmäßigerweise Opine-Promotor- und Terminator-Regionen verwendet werden, die eine konstitutive Expression des Nitrilasegens gewährleisten. Es können aber auch andere Promotoren und/oder Terminatoren eingesetzt werden, insbesondere Promotoren, die eine induzierbare Expression oder regulierte Expression in einem Pflanzenwirt ermöglichen. Geeignete Promotorregionen aus Ti-Plasmid sind Opinepromotoren, wie beispielsweise der Octopine-Synthase-Promotor, Nopaline-Synthase-Promotor, Agropine-Synthase-Promotor oder Mannopine-Synthase-Promotor. Andere Promotoren sind Virus-Promotoren, wie CaMV-Region VI-Promotor oder der Promotor mit der Gesamtlänge (35S), Promotoren, die mit Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylat-Genen verbunden sind, beispielsweise die kleine Untereinheit, oder Gene, die mit Phaseolin, Proteinspeicherung, B-Conglycinin oder Zellulosebildung verbunden sind.

Die verschiedenen Sequenzen können in herkömmlicher Weise aneinander gebunden werden. Die Promotorregion kann durch die Region am 5'-Ende des Strukturgens, z.B. das Opinegen, und durch Restriktionskartierung und Sequenzierung identifiziert werden; sie kann selektioniert und isoliert werden. Entsprechend kann die Terminatorregion als 3'-Region aus dem Strukturgen isoliert werden. Die Sequenzen können geklont und in der richtigen Orientierung aneinandergelinkt werden, sie ermöglichen die konstitutive Expression des Nitrilasegens in einem Pflanzenwirt.

Durch Einführen eines funktionellen, die Nitrilase exprimierenden Gens in Kulturpflanzenzellen können Bromoxynil,

Ioxynil und analoge Herbizide bei einer Vielzahl von Ertragspflanzen bei Konzentrationen verwendet werden, die die vollständige oder praktisch vollständige Unkrautvernichtung gewährleisten, ohne die Ernte wesentlich zu beeinträchtigen. Auf diese Weise können wirtschaftliche Vorteile erreicht werden, da Düngemittel und Wasser wirkungsvoller eingesetzt und die auf der Anwesenheit von Unkraut beruhenden Nachteile vermieden werden.

Die die Nitrilase exprimierende Expressionskassette kann in eine Vielzahl von Pflanzen eingeführt werden, sowohl einkeimblättrige wie auch zweikeimblättrige, einschließlich Mais, Weizen, Sojabohnen, Tabak, Baumwolle, Tomaten, Kartoffeln, Brassica-Arten, Reis, Erdnüsse, Petunien, Sonnenblumen, Zuckerrüben oder Rasen. Die Gene können in Zellen oder Pflanzenteilen vorhanden sein, wie Callus, Gewebe, Wurzeln, Knollen, Schößlinge, Stecklinge, Samen, Blätter, Keimlinge oder Pollen.

Um den Pflanzen Resistenz gegen 3,5-dihalogeniertes p-Hydroxybenzitril zu verleihen, können verschiedene Formulierungen zum Schutz der Ertragspflanzen vor Unkraut und folglich zur Erhöhung der Ernte und zur Verminderung des Wettbewerbs um Nährstoffe verwendet werden. Beispielsweise kann Bromoxynil als solches für die Postemergenzkontrolle des Unkrauts bei "sicheren" Kulturpflanzen, wie Sonnenblumen, Sojabohnen, Getreide oder Baumwolle, oder alternativ in Kombinationen mit anderen Produkten eingesetzt werden.

Es können übliche Mengen an Pestiziden auf Feldern verwen-

det werden in Formulierungen, die etwa 0,05 bis 1,98 kg/0,4 ha (0,1 bis 4 Pfund/a), vorzugsweise 0,09 bis 0,9 kg/0,4 ha (0,2 bis 2 Pfund/a) Bromoxynil abgeben, und das andere Herbizid in solchen Mengen enthalten, daß sie etwa 0,05 bis 1,98 kg/0,4 ha (0,1 bis 4 Pfund/a) Wirkstoff abgeben. Die Formulierungen können andere Hilfsstoffe, wie Reinigungsmittel, Hilfsmittel, Sprühhilfsmittel, Haftmittel oder Stabilisierungsmittel enthalten. Die Formulierungen können entweder naß oder trocken angewendet werden, beispielsweise als fließfähige Pulver, emulgierbare oder flüssige Konzentrate, wie sie an sich bekannt sind.

Herbizidlösungen können in herkömmlicher Weise angewendet werden, beispielsweise durch Besprühen, Begießen oder Zerstäuben.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert.

#### Ausführungsbeispiele:

#### Experimentelles

#### Material und Methoden

Restriktionsenzyme und T4-Ligasen für Verknüpfungen wurden gemäß den Empfehlungen der Hersteller verwendet. Standardmethoden beim Klonen und der Molekularanalyse wurden gemäß Maniatis et al. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982) durchgeführt. Die Klonanalyse wurde gemäß Ish-Horowitz et al. "Nucl. Acids Res.", 9 S. 2989 bis 2998 (1981) durchgeführt.

Für alle Klonierungsversuche wurde der Stamm *E. coli* MM294 verwendet (Hanahan, "Mol. Biol.", 166, S. 557 bis 580 (1983)).

Folgende Antibiotikamengen wurden eingesetzt: Chloramphenicol (Cm): 25 µg/ml; Tetracyclin (Tc): 10 µg/ml; Penicillin (Ap): 300 µg/ml.

Die Plasmid-DNA-Transformationen in *E. coli* wurden gemäß Mandel und Higa, "J. Mol. Biol.", 53, S. 159 bis 162 (1970) durchgeführt.

Bakterien aus einem mit Bromoxynil verseuchten Boden wurden isoliert und selektioniert. Einer dieser Organismen wurde als *Klebsiella pneumoniae* Unterart *ozaenae* identifiziert.

Die Teilreinigung und Charakterisierung der bromoxynilspezifischen Nitrilase aus diesem Organismus ergab ein aktives Enzym mit einer Scheinmolekularmasse von 34 kDal.

Nach wiederholter Kultivierung von *K. ozaenae* auf festem L-Agar wurde eine Variante isoliert, die nicht mehr fähig war, Bromoxynil als einzige Stickstoffquelle zu verwenden, wenn sie in einem definierten flüssigen Medium gezüchtet wurde, das je Liter 1,5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3,5 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 50 mg Hefeextrakt, je 0,1 % Citrat, Glycerin und Succinat und Spurenelemente enthielt (vgl. Barnett und Ingraham, "J. Appl. Bacteriol.", 18, S. 131 bis 143 (1975)). Dieses Medium wird im folgenden als YETE-Mehrfachkohlenstoffmedium bezeichnet. Dieses YETE-Mehrfachkohlenstoff-

medium enthielt 0,05 % Bromoxynil. Obwohl dieser Organismus Bromoxynil nicht als einzige Stickstoffquelle verwendet, wächst er in 0,05 % Bromoxynil enthaltender L-Brühe zur vollen Dichte. Eine Kolonie der *K. ozaenae*-Variante wurde ausgewählt und in 10 ml L-Brühe gezüchtet. Drei unabhängige *K. ozaenae*-Kolonien wurden von einer Bromoxynil enthaltenden LB-Platte ausgewählt und unter den gleichen Bedingungen gezüchtet. Diese vier gleichen *K. ozaenae*-Kolonien wurden gleichzeitig in 10 ml 0,05 % Bromoxynil enthaltender L-Brühe gezüchtet. Die Kulturen wurden bei 30° bis zur vollen Dichte gezüchtet, aus jeder Kultur wurde gemäß Ish-Horowitz et al. "Nucl. Acids Res.", 9, S. 2989 (1981) Plasmid-DNA im Minimaßstab hergestellt. Nicht verdaute Plasmid-DNA wurde auf 0,5 % Agarosegel der Elektrophorese unterworfen, die Plasmid-Streifen wurden durch Färben mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Die *K. ozaenae*-Variante zeigte eine einzige Plasmidart (mit einer Größe von 68 KB), die entweder in Anwesenheit oder Abwesenheit von Bromoxynil entstand. Die drei *K. ozaenae*-Kolonien zeigten eine größere Plasmidart (90 KB) wenn sie in Gegenwart von 0,05 % Bromoxynil gezüchtet wurden. In Abwesenheit von Bromoxynil sind beide Plasmidformen in zwei der drei *K. ozaenae*-Kolonien vorhanden.

Diese Ergebnisse deuten auf die Umwandlung der größeren Plasmidart in eine kleinere Form, wobei gleichzeitig eine Plasmid-DNA mit etwa 22 KB verlorengelht, wenn die Bromoxynil-Selektion aufgehoben wird.

Alle vier Kolonien wurden in 200 ml 0,05 % Bromoxynil enthaltender L-Brühe gezüchtet. Die Zellen wurden mit einer französischen Presse aufgebrochen, die Hochgeschwindigkeits-Überstände wurden gegen einen Puffer, der 0,05 mol/l  $K_2HPO_4$ , pH 7,5 und 2,5 mmol/l Dithiothreitol (DTT) enthielt, dialysiert. Die einzelnen Rohextrakte wurden auf Bromoxynil-spezifische Nitrilaseaktivität untersucht. Ein Rohextrakt aus der K. ozaenae-Variante enthielt keine nachweisbare Nitrilaseaktivität, während die anderen K. ozaenae-Rohextrakte spezifische Nitrilaseaktivitäten von 0,124, 0,105 bzw. 0,143  $\mu\text{mol NH}_3/\text{min}/\text{mg}$  Protein aufwiesen. 200 ml Zellen wurden bei 30 °C bis zur mittleren Log-Phase in M9-Medium, das 0,1 % Glucose und 0,04 % Bromoxynil enthielt, gezüchtet (Miller "Experiments in Molecular Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory (1972)). Durch Aufbrechen der Zellen, Ultrazentrifugieren und Dialyse des Überstands in Puffer mit 0,05 mol/l  $K_2HPO_4$ , pH 7,5, und 2,5 mmol/l DTT wurden Rohextrakte hergestellt. Die Substratkonzentration betrug in allen Versuchen 3 mmol/l Bromoxynil. Die Freisetzung von  $\text{NH}_3$  wurde gemäß Harper "Biochem. J.", 167, S. 685-692 (1977) überwacht. Die Fähigkeit der K. ozaenae-Variante, in Bromoxynil enthaltender L-Brühe zu wachsen, kann auf einer erworbenen Undurchlässigkeit des Organismus für die Verbindung beruhen. Der Organismus kann jedoch in bestimmten Medien unter Verwendung von Bromoxynil als einzige Stickstoffquelle nicht wachsen.

Zusammenfassend scheint die K. ozaenae-Nitrilase im Plasmid codiert zu sein. Das (die) das Enzym codierende Gen(e) scheint (scheinen) auf einem 22 KB-Plasmid-DNA-Segment zu

liegen, das spontan aus dem *K. ozaenae*-Plasmid in Abwesenheit der Bromoxynil-Selektion verlorengeht.

Die Bromoxynil-spezifische Nitrilase aus *K. ozaenae* wird in *E. coli* exprimiert.

Es wurde Plasmid-DNA aus *K. ozaenae*, die unter 0,05 % Bromoxynil-Selektion gezüchtet wurden, hergestellt und in *E. coli* MM294 (*thi*, *gyrA96*, *endI*<sup>-</sup>, *hsdR17*) transformiert.

Die Transformanten wurden auf stickstoff-freiem (N<sup>-</sup>) festem Agarose-Minimalmedium, das je Liter 1,5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O und 0,1 % Glucose sowie 0,05 % Bromoxynil als einzige Stickstoffquelle enthielt, selektioniert. Nach 5-tägiger Inkubation erschienen 10 Kolonien auf den Selektionsplatten. Diese Kolonien wurden auf 0,05 % Bromoxynil enthaltenden L-Agarplatten ausgestrichen und auf die Anwesenheit des auxotrophen Thiamin-Markers in MM294 untersucht. Keine der Kolonien wuchs in Minimalmedia in Abwesenheit von Thiamin, das angibt, daß der Stamm *E. coli* MM294 ist. Alle Kolonien wuchsen im M9-Medium, das mit Thiamin und 0,05 % Bromoxynil als einzige Stickstoffquelle versetzt wurde. Kein Wachstum wurde in diesem Medium in Abwesenheit von Bromoxynil beobachtet. Zwei der Kolonien wurden für weitere Analysen ausgewählt. Wurden Rohextrakte von *E. coli* MM294, das das 90 KB-Plasmid enthielt, auf Bromoxynil-spezifische Nitrilaseaktivität untersucht, so wurde eine spezifische Aktivität von 0,216 µmol freigesetztem NH<sub>3</sub>/min/mg festgestellt. In *E. coli* MM294, das die kleinere Plasmidart enthielt, konnte keine Nitrilaseaktivi

tät nachgewiesen werden. Das größere 90 KB Plasmid in *E. coli* wurde mit pBrx1, das kleinere Plasmid (68 KB) mit pBrx1Δ bezeichnet.

Zur Bestätigung, daß der *E. coli*-Stamm MM294, der das Plasmid pBrx1 enthält, den richtigen Metaboliten als Ergebnis einer Bromoxynil-spezifischen Nitrilasereaktion produziert, wurde eine 2 ml-MM294-Kultur (pBrx1) 24 h bei 30 °C in 0,05 % Bromoxynil enthaltendem M9-Medium gezüchtet. Eine Probe des Kulturfiltrats wurde auf einer C<sub>18</sub>-Hochdruck-Flüssigchromatographiesäule chromatographiert. Die Gesamtmenge an im Kulturfiltrat vorhandenem Bromoxynil wurde zu einem neuen Metabolitgipfel umgewandelt. Der Metabolitgipfel wurde durch Spektralanalyse als 3',5'-Dibrom-4-hydroxybenzoesäure (DBHB) identifiziert. D.h., das Produkt der Bromoxynil-spezifischen, plasmidcodierten Nitrilase-expression in *E. coli* ist das gleiche wie das von *K. ozae-nae*.

Das Bromoxynil-spezifische Nitrilasegen wird in *E. coli* kloniert.

Um festzustellen, ob das das Bromoxynil-spezifische Enzym codierende DNA-Segment in *E. coli* klonierbar ist, wurde das Plasmid pBrx1 mit BamHI gespalten, wobei zwei Streifen mit 53 KB bzw. 37 KB erhalten wurden. Die BamHI-Fragmente wurden in die BamHI-Stelle des *E. coli*-Plasmidvektors pACYC184 eingebunden (Chang und Cohen, "J. Bacteriol." 134, S. 1141 (1978)) und in *E. coli* MM294 transformiert. Das Klonen von pACYC184 in der BamHI-Stelle führt zu einer

Einschub-Inaktivierung des Tetracyclin-Resistenzgens. 10 chloramphenicolresistente, tetracyclinempfindliche MM294-Kolonien wurden ausgewählt, im Minimaßstab eine Klonanalyse-DNA hergestellt und mit BamHI gespalten. Vier Klone enthielten das 37 KB-BamHI-Fragment, während ein Klon das größere 53 KB-BamHI-DNA-Fragment von pBrx1 aufwies. Fünf Klone enthielten ein geklontes BamHI-Fragment, das auch im Plasmid pBrx1Δ gefunden wurde und dem DNA-Segment entspricht, das nach der spontanen Deletion des 22 KB-Segments der Plasmid-DNA aus pBrx1 zurückbleibt. Alle 10 Klone wurden in 200 ml L-Brühe in Anwesenheit von 20 µg/ml Chloramphenicol (zur Selektion des Plasmids) gezüchtet, die erhaltenen Rohextrakte wurden auf Bromoxynil-spezifische Nitrilaseaktivität untersucht. Vier Klone, die das 37 KB-BamHI-Fragment enthielten, zeigten spezifische Nitrilaseaktivitäten im Bereich von 0,140 µmol freigesetztem NH<sub>3</sub>/min/mg Protein, wogegen in den anderen sechs Klonen keine Nitrilaseaktivität nachweisbar war. Diese Ergebnisse zeigen, daß sich das eine Bromoxynil-spezifische Nitrilaseaktivität codierende Gen auf einem 37-KB-BamHI-Fragment befindet, das aus dem Plasmid pBrx1 geklont wird, und daß das 22 KB-DNA-Segment, das spontan in Abwesenheit der Bromoxynilselektion verlorenght, zu dem 37 KB-BamHI-Fragment gehört.

Um die Orientierung der BamHI-Fragmente in bezug auf den Vektor pACYC184 zu bestätigen, wurde die DNA aus den oben angegebenen vier Klonen mit EcoRI gespalten und der Elektrophorese auf einem 0,07 %-igen Agarosegel unterworfen. Ein kombiniertes EcoRI-Abbauprodukt der Plasmide pBrx1 und

pBrx1A wurde ebenfalls untersucht.

Beide Orientierungen des 37 KB-BamHI-Fragments in bezug auf den Vektor pACYC184 wurden bestimmt und als Plasmide pBrx2 und pBrx3 bezeichnet. Es wurde auch festgestellt, daß die drei EcoRI-Fragmente zu dem 22 KB-DNA-Segment gehören, das spontan aus den Plasmiden pBrx2 und pBrx3 abgespalten wird. Diese EcoRI-Fragmente haben eine Größe von 18 KB, 3 KB bzw. 1,9 KB. Das die Bromoxynil-spezifische Nitrilase codierende Gen sollte sich innerhalb eines dieser drei EcoRI-Fragmente befinden, wenn das Nitrilase-Strukturgen nicht durch eine EcoRI-Restriktionsstelle geteilt ist.

Die Lokalisierung der Bromoxynil-spezifischen Nitrilase von *E. coli* (pBrx3) wurde untersucht, es wurden folgende Ergebnisse erhalten:

Tabelle 1

Die Bromoxynil-spezifische Nitrilase ist ein periplasmisches Enzym in *E. coli*.

Kulturbedingungen <sup>a</sup>	Spezifische Nitrilaseaktivität <sup>b</sup>
mit Toluol behandelte Zellen (L-Brühe)	0,829
mit Lysozym behandelte Zellen (L-Brühe)	0,796
Gesamtzellen (L-Brühe)	0,770
Gesamtzellen (L-Brühe + Brx1)	1,25
Gesamtzellen (M9)	0,950
Gesamtzellen (M9 + Brx1)	1,45
Gesamtzellen/pACYC184 (M9)	0

<sup>a</sup> *E. coli* (MM294)-Zellen, die das Plasmid pBrx3 enthielten, wurden in 5 ml-Kulturen bei 37 °C in dem angegebenen Medium bis zur stationären Phase gezüchtet. Die Kulturen enthielten, wo angegeben, 20 µg/ml Chloramphenicol und 0,04 % Bromoxynil (Brx1). 1 ml jeder Kultur wurde gesammelt, einmal mit Nitrilasepuffer (0,1 mol/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,5) gewaschen. Die Zellen wurden in 0,1 ml dieses Puffers wieder suspendiert. 50 µl-Proben wurden gemäß Harper "Biochem. J.", 167, S. 685 bis 692 (1977) mit und ohne 3 mmol/l Bromoxynil als Substrat auf Nitrilaseaktivität untersucht.

<sup>b</sup> µmol NH<sub>3</sub>/min/mg. Das Protein wurde als OD<sub>600</sub> = 1,4 = 10<sup>9</sup> Zellen/ml = 150 µg bestimmt.

Diese Ergebnisse zeigen, daß sich die Nitrilase im periplasmatischen Raum der Zelle befindet. Eine zweite Beobachtung ist, daß das Enzym in Abwesenheit von Bromoxynil im Medium exprimiert wird, was darauf hindeutet, daß die Brom-

oxynil-Induktion für die Enzymexpression nicht notwendig ist.

### Weitere Reinigung der Bromoxynil-spezifischen Nitrilase

Die weitere Reinigung der *K. ozaenae*-Nitrilase wurde mit folgenden Ergebnissen durchgeführt:

Tabelle 2

Reinigung der Bromoxynil-spezifischen Nitrilase  
von *E. coli*  
(Ausgangsmaterial: 6 g Zellen)

Fraktion	Volumen	Protein	$\mu\text{mol NH}_3/\text{min}$	S.A. <sup>b</sup>
Roh <sup>a</sup>	100 ml	210 mg	18,15	0,086
35-50 % NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	6 ml	83 mg	26,77	0,250
DEAE- Sephadex	56 ml	19 mg	15,52	0,820

<sup>a</sup> Die Zellen wurden bei 30 °C bis zur mittleren Log-Phase in M9-Medium, das 0,04 % Bromoxynil und Glucose enthielt, gezüchtet. Die Rohextrakte wurden durch Aufbrechen der Zellen, Ultrazentrifugieren und Dialyse in einem Puffer, der 0,05 mol/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,5, und 2,5 mmol/l DTT enthielt, hergestellt. Die Substratkonzentration betrug bei allen Nitrilaseversuchen 3 mmol/l.

<sup>b</sup>  $\mu\text{mol NH}_3/\text{min}/\text{ng}$ .

Eine 2,5 cm<sup>2</sup> x 10 cm große Säule wurde mit Puffer, der 0,05 % K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,5, 2,5 mmol/l DTT und 1 mmol/l EDTA enthielt, equilibriert. Die Probe wurde aufgebracht, die Säule wurde

mit 300 ml eines linearen Gradienten von 0,02 bis 0,40 mol/l NaCl im oben angegebenen Säulenpuffer entwickelt. 1 mol/l NaCl enthaltender Puffer wurde am Ende des Gradienten aufgegeben. Es wurden 5 ml-Fraktionen gesammelt, 0,075 ml-Proben verschiedener Fraktionen wurden auf Nitrilaseaktivität untersucht. Ein einziger Gipfel mit Enzymaktivität wurde bei 0,22 mol/l Salz eluiert. Etwa 75 % der aufgegebenen Nitrilaseaktivität wurden in den aktiven Fraktionen wiedergewonnen.

Die Fraktionen, die dem Nitrilasegipfel aus der DEAE-Säule entsprachen, wurden gegen 0,02 mol/l  $K_2HPO_4$ , pH 5 dialysiert; 50  $\mu$ l (6  $\mu$ g Protein) jeder Fraktion wurden auf 11,25 %-iges denaturiertes Laemmli-Gel aufgegeben. Die mit Protein angereicherte Bande, die dem Aktivitätsgipfel aus der DEAE-Säule entspricht, ist ein Polypeptid mit einer Molekülmasse von 34.000. Es wurden keine anderen Polypeptide in den aktiven Säulenfraktionen angereichert. Diese Ergebnisse bestätigen, daß die Bromoxynil-spezifische Nitrilase ein Polypeptid mit einer Molekülmasse von etwa 34.000 ist, das vermutlich das Produkt eines einzigen Gens ist.

Der pBrx2-Klon wurde vollständig mit EcoRI gespalten, dabei wurde ein Fragment von etwa 19 KB isoliert. Das Fragment wurde in den EcoRI-abgebauten pACYC184-Vektor (3,9 KB) zu dem Plasmid pBrx5 eingebaut, das wie oben beschrieben in *E. coli* transformiert wurde. Das Plasmid wurde in herkömmlicher Weise isoliert und mit BglII zu einem Fragment mit etwa 6,7 KB abgebaut, das in dem Vektor pACYC184 bleibt.

Das isolierte Plasmid pBrx7 wurde mit SmaI und BglII zu einem Fragment mit etwa 3,9 KB verdaut, das in SmaI-BamHI-abgebautes pACYC177 (3,7 KB) eingebaut wurde (Chang und Cohen, "J. Bacteriol.", 134, S. 1141 bis 1156 (1978)). Das entstandene Plasmid, das Penicillinresistenz verleiht, wurde in E. coli wie oben beschrieben transformiert; die Transformanten wurden auf einem penicillinselektiven Medium zu einem Plasmid pBrx8 selektioniert, das das Nitrilasegen auf einem 3,9 KB-Fragment trägt.

pBrx8 wurde mit PstI teilabgebaut, die Fragmente wurden in PstI-verdaulichem pUC18 eingebaut (Yanisch-Perron et al., "Gene", 33, S. 103-119 (1985)). Die entstandenen Plasmide wurden in E. coli kloniert und auf Nitrilaseaktivität untersucht. Ein Klon wies ein 5,3 KB-Plasmid pBrx9 auf, das isoliert und mit PstI und HincII weitergespalten wurde, wobei ein Fragment mit 1210 BP entstand, das in Richtung von PstI zu HincII, ClaI, SalI, ScaI und SphI-Restriktionsstellen in relativ gleichmäßigen Abständen hat. Das PstI-HincII-Fragment wurde gemäß Sanger et al., "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", 74, S. 5463-5468 (1977) sequenziert. Die Sequenz (mit den entsprechenden codierten Aminosäuren) ist im folgenden angegeben:

65

CTGCAGGATAGTAGGGCTTGAAGAGGATACGCTGTTTGGCGAGCCATCAAATAAGGGGATTTTC

95 125

ATG GAC ACC ACT TTC AAA GCA GCC GCT GTT CAG GCC GAA CCG GTA TGG ATG GAT GCC GCT  
Met Asp Thr Thr Phe Lys Ala Ala Ala Val Gln Ala Glu Pro Val Trp Met Asp Ala Ala

155 185

GCA ACA GCC GAT AAG ACC GTG ACG CTA GTA GCT AAA GCC GCA GCG GCT GGC GCG CAG CTC  
Ala Thr Ala Asp Lys Thr Val Thr Leu Val Ala Lys Ala Ala Ala Ala Gly Ala Gln Leu

215 245

GTC GCA TTT CCC GAA TTG TGG ATT CCG GGC TAC CCA GGA TTC ATG CTC ACG CAC AAC CAA  
Val Ala Phe Pro Glu Leu Trp Ile Pro Gly Try Pro Gly Phe Met Leu Thr His Asn Gln

275 305

ACC GAA ACC CTA CCA TTC ATC ATT AAA TAC CGC AAG CAG GCA ATC GCC GCC GAT GGA CCA  
Thr Glu Thr Leu Pro Phe Ile Ile Lys Try Arg Lys Gln Ala Ile Ala Ala Asp Gly Pro

335 365

GAA ATC GAA AAA ATT CGC TGC GCG GCT CAG GAG CAT AAC ATT GCG CTC TCC TTT GGG TAC  
Glu Ile Glu Lys Ile Arg Cys Ala Ala Gln Glu His Asn Ile Ala Leu Ser Phe Gly Tyr

395 425

AGC GAA CGG GCT GGC CGT ACT CTC TAC ATG TCA CAA ATG CTT ATC GAT GCC GAT GGC ATC  
Ser Glu Arg Ala Gly Arg Thr Leu Tyr Met Ser Gln Met Leu Ile Asp Ala Asp Gly Ile

455 485

ACC AAA ATT CGT CGT CGA AAG CTC AAA CCA ACC CGC TTT GAA CGA GAA CTC TTT GGC GAA  
Thr Lys Ile Arg Arg Arg Lys Leu Lys Pro Thr Arg Phe Glu Arg Glu Leu Phe Gly Glu

515 545

GGT GAC GGA TCG GAC TTA CAG GTC GCC CAA ACT AGC GTT GGT CGG GTG GGT GCC CTC AAC  
Gly Asp Gly Ser Asp Leu Gln Val Ala Gln Thr Ser Val Gly Arg Val Gly Ala Leu Asn

575 605

TGC GCG GAG AAT TTG CAG TCG CTA AAC AAC TTT GCG CTT GCT GCC GAG GGT GAA CAG ATA  
Cys Ala Glu Asn Leu Gln Ser Leu Asn Lys Phe Ala Leu Ala Ala Glu Gly Glu Gln Ile

635 665  
 CAT ATC TCC GCC TGG CCA TTC ACG CTT GGA AGC CCT GTG CTC GTC GGA GAC TCC ATC GGC  
 His Ile Ser Ala Trp Pro Phe Thr Leu Gly Ser Pro Val Leu Val Gly Asp Ser Ile Gly

695 725  
 GCC ATC AAC CAG GTC TAC GCG GCC GAG ACG GGG ACC TTC GTT CTC ATG TCG ACG CAG GTG  
 Ala Ile Asn Gln Val Tyr Ala Ala Glu Thr Gly Thr Phe Val Leu Met Ser Thr Gln Val

755 785  
 GTT GGA CCG ACC GGC ATC GCC GCC TTC GAG ATC GAA GAC AGG TAC AAC CCG AAT CAG TAT  
 Val Gly Pro Thr Gly Ile Ala Ala Phe Glu Ile Glu Asp Arg Tyr Asn Pro Asn Gln Tyr

815 845  
 CTT GGT GGT GGG TAC GCG CCG ATC TAC GGG CCT GAC ATG CAG TTG AAG AGC AAG TCG TTG  
 Leu Gly Gly Gly Tyr Ala Arg Ile Tyr Gly Pro Asp Met Gln Leu Lys Ser Lys Ser Leu

875 905  
 TCA CCG ACC GAA GAG GGC ATC GTC TAC GCC GAG ATC GAC CTG TCG ATG CTT GAG GCA GCA  
 Ser Pro Thr Glu Glu Gly Ile Val Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Ser Met Leu Glu Ala Ala

935 965  
 AAG TAC TCG CTC GAT CCC ACG GGC CAC TAT TCG CGC CCT GAT GTG TTC AGC GTG TCG ATT  
 Lys Tyr Ser Leu Asp Pro Thr Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Phe Ser Val Ser Ile

995 1025  
 AAC CGG CAA CGG CAG CCT GCG GTG TCA GAA GTT ATC GAC TCA AAC GGT GAC GAG GAC CCG  
 Asn Arg Gln Arg Gln Pro Ala Val Ser Glu Val Ile Asp Ser Asn Gly Asp Glu Asp Pro

1055 1085  
 AGA GCA GCA TGC GAG CCC GAC GAG GGG GAT CGT GAG GTC GTA ATC TCT ACG GCA ATA GGG  
 Arg Ala Ala Cys Glu Pro Asp Glu Gly Asp Arg Glu Val Val Ile Ser Thr Ala Ile Gly

1115 1155  
 GTT CTA CCC CGT TAT TGC GGA CAT TCC TAATAAAAAGAGACACCTGGTACCAAAGGGGTGTTTCATGTCCA  
 Val Leu Pro Arg Tyr Cys Gly His Ser

1200  
 GACGCAGAAAATATAGCCCAGAGTTAAAACGCGAAGCCATCGCTTTAACCCGTC AAC

Das von den nicht codierenden flankierenden Regionen am 5'- und 3'- Ende praktisch freie PstI-HincII-Fragment kann mit EcoRI-Linkern verknüpft und mit EcoRI gespalten werden und ist dann fertig, um in eine Pflanzenexpressionskassette durch Einschub in die EcoRI-Stelle von pCGN451 eingeführt zu werden.

pCGN451 umfaßt eine Octopin-Kassette, die etwa 1566 BP der 5'-nichtcodierenden Region, die über einen EcoRI-Linker an das 3'-Ende des Gens gebunden ist, und etwa 1349 BP der 3'-nichtcodierenden DNA enthält. Die pTi-Koordinaten sind 11.207 bis 12.823 für die 3'-Region und 13.643 bis 15.208 für die 5'-Region (definiert gemäß Barker et al. "Plant Molecular Biology", 2, S. 335 (1983)).

Das 5'-Fragment wurde wie folgt erhalten: ein kleines unterkloniertes Fragment, das das 5'-Ende der codierenden Region als BamHI-EcoRI-Fragment enthält, wurde in pBR322 als Plasmid pCGN407 geklont. Das BamHI-EcoRI-Fragment hatte eine XmnI-Stelle in der codierenden Region, während pBR322 zwei XmnI-Stellen aufwies. pCGN407 wurde mit XmnI abgebaut, mit Bal31-Nuklease gespalten. Den Fragmenten wurden EcoRI-Linker zugegeben. Nach dem Abbau mit EcoRI und BamHI wurden die Fragmente nach Größe fraktioniert, die Fraktionen geklont und sequenziert. In einem Fall wurde die ganze codierende Region und 10 BP der 5'-nichtübersetzten Sequenzen entfernt, wobei die 5'-nichttranskribierte Region, die mRNA-Kappenstelle und 16 BP der 5'-nichtübersetzten Region (zu einer BamHI-Stelle) intakt zurückblieben. Dieses kleine Fragment wurde durch Größenfraktionierung auf einem 7 %-

igen Acrylamidgel erhalten, etwa 130 BP lange Fragmente wurden eluiert. Diese nach Größe fraktionierte DNA wurde in M13mp9 eingebunden; verschiedene Klone wurden sequenziert, die Sequenz wurde mit der bekannten Sequenz des Octopin-Synthase-Gens verglichen. Die M13-Konstruktion wurde mit pI4 bezeichnet, dieses Plasmid wurde mit BamHI und EcoRI zu einem kleinen Fragment gespalten, das an ein XhoI-BamHI-Fragment, das stromaufwärts 5'-Sequenzen von pTiA6 (Garfinkel und Nester, "J. Bacteriol.", 144, S. 732 (1980)) enthielt, und an ein EcoRI-XhoI-Fragment, das 3'-Sequenzen enthielt, gebunden. Das entstandene XhoI-Fragment wurde in die XhoI-Stelle eines pUC8-Derivats mit der Bezeichnung pCGN426 geklont. Dieses Plasmid unterscheidet sich von pUC8 dadurch, daß die einzige EcoRI-Stelle mit DNA-Polymerase I gefüllt ist und dadurch, daß es die PstI- und HindIII-Stelle durch Nukleaseverunreinigung der HincII-Restriktionsendonuklease verloren hat, wenn ein XhoI-Linker in die einzige HincII-Stelle von pUC8 eingebaut wird. Das entstandene Plasmid pCGN451 hat eine einzige EcoRI-Stelle für den Einbau von Protein-codierenden Sequenzen zwischen der 5'-nichtcodierenden Region (die 1.550 BP der 5'-nichttranskribierten Sequenz einschließlich des rechten Randes von T-DNA, die mRNA-Kappenstelle und 16 BP der 5'-nichtübersetzten Sequenz enthält) und der 3'-Region (die 267 BP der codierenden Region, das Stopcodon, 196 BP der 3'-nichtübersetzten DNA, die PolyA-Stelle und 1.153 BP der 3'-nichttranskribierten Sequenz enthält).

Das XhoI-Fragment, das die Octopin-Synthase (ocs)-Kassette enthält, wurde in das Plasmid pCGN517 eingebaut, das Tetra-

cyclin- und Kanamycin-Resistenzgene aufweist.

pCGN517 wurde aus pHC79 (Hohn, "Gene", 11, S. 291 (1980)) durch Einführung in die einzige PstI-Stelle des Kan<sup>r</sup>-Gens aus pUC4K (Vieira, "Gene", 19, S. 259 (1982)) hergestellt. pCGN517 wurde mit SalI abgebaut, das XhoI-Fragment wurde in die einzige SalI-Stelle eingebaut.

Das XhoI-Fragment wurde auch in ein zweites Plasmid pCGN529 eingebaut. pCGN529 wurde aus pACYC184 durch Einbau des Kan<sup>r</sup>-Gens aus Tn5 hergestellt (Rothstein et al., "Movable Genetic Elements", S.99, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1981). Ein BglII-Fragment mit einer Größe von 2,4 KB aus pRIA4-T<sub>L</sub>-DNA (White und Nester, "J. Bacteriol", 144, S. 710 (1980)), das in die BamHI-Stelle eingeführt wurde, blieb nach der Substitution des HindIII-BamHI-Fragments von pACYC184 mit dem Kan<sup>r</sup>-Gen von Tn5 zurück.

Das XhoI-Fragment, das die ocs-Kassette enthielt, in die das EcoRI-Nitrilasegen an der einzigen EcoRI-Stelle der ocs-Kassette eingebaut ist, wurde in pCGN517 und pCGN529 eingebaut. Dabei wurden zwei Plasmide pN1 bzw. pN2 erhalten, die für die Einführung in *A. tumefaciens* oder *A. rhizogenes* zur Integration der T-DNA der Ti- oder Ri-Plasmide verwendet wurden. Die Integration in die entsprechenden Plasmide kann in einem 3-Stufen-Verfahren gemäß Comai et al., "Plasmid", 10, S. 21-30 (1983) durchgeführt werden. Übernachtskulturen eines *E. coli*-Wirts, der die Plasmide pRK2073, pN1 oder pN2 und *A. tumefaciens* A722 (Garfinkel,

J. Bacteriol", 144, S. 732 (1980)) oder *A. rhizogenes* A4T (White. *ibid.*, 144, S. 710 (1980)) enthielten, wurden über Nacht gezüchtet. Die Kulturen wurden vermischt und auf AB-Platten, die 150 µg/ml Kanamycin enthielten, ausgestrichen. Einzelne Kolonien wurden zweimal ausgestrichen. Die richtige Integration wurde durch die Southern-Analyse der Gesamt-Agrobacterium-DNA nachgeprüft. Endonuklease-abgebaute DNA wurde mit kerben-übersetztem (nick-translated) pLrx8 untersucht.

Das Bromoxynil-spezifische Nitrilasegen wird in Gallengewebe exprimiert.

Das Plasmid pBrx9, das das Nitrilasegen auf einem 2,6 KB-Fragment trägt, wurde mit BamHI abgebaut und mit Bal31 zur Entfernung eines Teils der 5'-flankierenden Region behandelt. Es wurden BamHI-Linker zugegeben und der Ring wieder geschlossen. Die entstandenen Plasmide, die Ampicillinresistenz verleihen, wurden wie oben beschrieben in *E. coli* transformiert. Die Transformanten wurden auf einem Ampicillin-selektiven Medium zu den 5,2 KB-Plasmiden pBrx16 bzw. pBrx17 selektioniert, die das Nitrilasegen auf einem 2,6 KB-Fragment tragen. pBrx16 wurde mit BamHI gespalten und mit HincII teilabgebaut, wobei ein 1,2 KB-Nitrilasegen-Fragment entstand.

Das BamHI-HincII-Fragment wurde in mit BamHI-SmaI abgebautem pCGN46 eingebaut, wobei das 6,6 KB-Plasmid pBrx22 entstand, das das Nitrilasegen-Fragment enthält.

pCGN46 (Comai et al., "Nature", 317, S. 741-744 (1985)) ist eine Mannopin-Synthase (MAS)-Expressionskassette und enthält einen MAS-Promotor und eine ocs-3'-Region. pCGN46 wurde wie folgt hergestellt: ein EcoRI-Fragment (Eco13 oder EcoC) mit etwa 5.500 BP, das einen Teil der T<sub>R</sub>-DNA (Barker et al., "Plant Mol. Biol.", 2, S. 325 (1983)) einschließlich der Mannopin-Synthase-Promotorregion (P<sub>MAS</sub>) trägt, wurde in einem mit pVK232 gezeichneten Vektor geklont. Nach Abbau von pVK232 mit EcoRI wurde Eco13 in die EcoRI-Stelle von pACYC184 zu einem Plasmid pCGN14 eingebaut. pCGN14 wurde mit SphI und ClaI (jeweils an Pos. 21562 und 20128 der Barker-Sequenz, w.o.) gespalten, um die P<sub>MAS</sub>-Region zu entfernen, die in pUC19 (Pharmacia Inc.), das mit SphI und AccI abgebaut wurde, eingebaut. Es entstand pCGN40. Die P<sub>MAS</sub>-Region umfaßt eine ClaI-Erkennungsstelle, die methyliert ist, um sie gegen den Abbau resistent zu machen.

pCGN40 wurde mit EcoRV und EcoRI gespalten, dort wo sich die EcoRV-Stelle in der T<sub>R</sub>-DNA befindet, während die EcoRI-Stelle in dem Polylinker von pUC19 ist; dabei entsteht ein Fragment mit der P<sub>MAS</sub>-Region. pCGN451, das die Octopin-Synthase-Kassette enthält, wurde mit SmaI und EcoRI abgebaut, das größere Fragment, aus dem die Octopin-Synthase-5'-Region entfernt worden ist, wurde isoliert. Die EcoRV-EcoRI-P<sub>MAS</sub>-Region wurde in pCGN451 anstelle der Octopin-Synthase-5'-Region eingebaut, dort wo die Transkriptions-Startregion und die -Endregion durch einen Polylinker getrennt sind; es entsteht pCGN46.

Das Plasmid pBrx22, das das 1,2 KB-Nitrilasegen-Fragment

enthielt, wurde, wie oben beschrieben, in *E. coli* transformiert. Das Plasmid wurde in herkömmlicher Weise isoliert und mit *Xho*I zu einem 4,1 KB-Fragment abgebaut, das den MAS-Promotor, das Bromoxynilgen mit 25 BP der bakteriellen 5'-nicht-übersetzten Sequenz und die *ocs*-3'-Region enthielt. Das 4,1 KB-Fragment wurde in das mit *Sal*I abgebaute Plasmid pCGN783 eingeführt, dabei entstand das Plasmid pBrx28 mit etwa 31 KB.

#### Herstellung von pCGN783

#### Herstellung von pCGN167

Zur Herstellung von pCGN167 wurde das *Alu*I-Fragment von CaMV (7144 bis 7735 BP, Gardner et al., "Nucl. Acids Res.", 9, S. 2871-2888 (1981)) durch Abbau mit *Alu*I erhalten und in die *Hinc*II-Stelle von M13mp7 (Vieira, "Gene", 19, S. 259 (1982)) zu C614 geklont. Durch *Eco*RI-Abbau von C614 wurde das *Eco*RI-Fragment von C614 erhalten, das den 35S-Promotor enthielt, der in die *Eco*RI-Stelle von pUC8 (Vieira et al., "Gene", 19, S. 259 (1982)) zu pCGN146 geklont wurde.

Um die Promotorregion zu trimmen, wurde die *Bgl*II-Stelle (7670 BP) mit *Bgl*II und *Bal*31 behandelt; dann wurde ein *Bgl*II-Linker an die mit *Pal*31 behandelte DNA zur Herstellung von pCGN147 gebunden.

pCGN148a, das eine Promotorregion, einen selektionierbaren Marker (KAN mit 2 ATG) und eine 3'-Region enthielt, wurde durch Abbau von pCGN528 (s.u.) mit *Bgl*II und Einführen des

BamHI-BglIII-Promotor-Fragments aus pCGN147 hergestellt. Dieses Fragment wurde in die BglIII-Stelle von pCGN528 geklont, so daß die BglIII-Stelle in der Nähe des Kanamycingens von pCGN528 ist.

Der für diese Konstruktion verwendete Pendelvektor (shuttle vector) pCGN528, wurde wie folgt hergestellt: pCGN525 wurde durch Abbau eines Plasmids, das Tn5 mit einem Kanamycingen (Jorgenson et al., "Mol. Gen.", 177, S. 65 (1979)) enthält, mit HindIII-BamHI und Einführen des HindIII-BamHI-Fragments, das das Kanamycingen enthält, in die HindIII-BamHI-Stellen des Tetracyclingens von pACYC184 (Chang und Cohen, "J.Bacteriol", 134, S. 1141-1156 (1978)) hergestellt.

pCGN526 wurde durch Einführen des BamHI-Fragments 19 von pTiA6 (Thomashow et al., "Cell", 19, S. 729-739 (1980)) in die BamHI-Stelle von pCGN525 hergestellt.

pCGN528 wurde durch Entfernen des kleinen XhoI-Fragments aus pCGN526 durch Abbau mit XhoI und Wiederverknüpfen erhalten.

pCGN149a wurde durch Klonen des BamHI-Kanamycingen-Fragments aus pMB9KanXXI in die BamHI-Stelle von pCGN148a hergestellt.

pMB9KanXXI ist eine pUC4K-Variante (Vieira und Messing, "Gene", 19, S. 259-268 (1982)), der die XhoI-Stelle fehlt, die jedoch ein funktionelles Kanamycingen aus Tn903 enthält, das eine wirkungsvolle Selektion in Agrobacterium ermöglicht.

pCGN149a wurde mit BglII und SphI abgebaut. Dieses kleine BglII-SphI-Fragment von pCGN149a wurde durch das BamHI-SphI-Fragment aus M1 (siehe unten) ersetzt, das durch Abbau mit BamHI und SphI isoliert wurde. Dabei entsteht pCGN167, eine Konstruktion, die einen CaMV-Promotor mit voller Länge, 1-ATG-Kanamycingen, das 3'-Ende und das bakterielle Tn903-Kanamycingen enthält.

M1 ist ein EcoRI-Fragment aus pCGN550 (siehe Herstellung von pCGN587), das in die EcoRI-Klonierstelle von M13mp9 so geklont wurde, daß die PstI-Stelle in dem 1-ATG-Kanamycingen in der Nähe der Polylinkerregion von M13mp9 ist.

Herstellung der 709 (1-ATG-Kanamycin - 3'-Region)

pCGN566 enthält den EcoRI-HindIII-Linker von pUC18 (Yanisch-Perron, *ibid*), der in die EcoRI-HindIII-Stellen von pUC13-cm eingeführt wurde (K. Buckley, Dissertation, UC-San Diego, 1985). Das HindIII-BglII-Fragment von pNW31c-8, 29-1 (Thomashow et al., "Cell", 19, S. 729 (1980)), das ORF1 und 2 enthält (Barker et al., siehe oben (1983)), wurde in die HindIII-BamHI-Stelle von pCGN566 zu pCGN703 subkloniert.

Das Sau3A-Fragment von pCGN703, das die 3'-Region des Transkripts 7 von pTiA6 enthält (entsprechend den Basen 2396-2920 von pT115955 (Barker et al., siehe oben (1983))), wurde in die BamHI-Stelle von pUC18 (Yanisch-Perron et al., siehe oben (1985)) zu pCGN709 subkloniert.

Herstellung von pCGN766c (35S-Promotor - 3'-Region)

Das HindIII-BamHI-Fragment von pCGN167 (Herstellung siehe unten), das den CaMV-35S-Promotor, das 1-ATG-Kanamycingen und das BamHI-Fragment 19 von pTiA6 enthält, wurde in die BamHI-HindIII-Stellen von pUC19 geklont (Norrander et al., siehe oben (1983); Yanisch-Perron et al., siehe oben (1985)); es entstand pCGN976.

Der 35S-Promotor und die 3'-Region aus dem Transkript 7 wurden durch Einführen eines 0,7 KB-HindIII-EcoRI-Fragments von pCGN976 (35S-Promotor) und des 0,5 KB-EcoRI-SalI-Fragments von pCGN709 (Transkript 7:3', Herstellung siehe oben) in die HindIII-SalI-Stellen von pCGN566 hergestellt; es entstand pCGN766c.

Endaufbau von pCGN783

Das 0,7 KB-HindIII-EcoRI-Fragment von pCGN766c (CaMV-35S-Promotor) wurde an das 1,5 KB-EcoRI-SalI-Fragment von pCGN726c (1-ATG-KAN-3'-Region) in die HindIII-SalI-Stellen von pUC119 (J. Vieira, Rutgers University, N.J.) gebunden; es entstand pCGN778.

Die 2,2 KB-Region von pCGN778, das HindIII-SalI-Fragment, das die CaMV-35S-Promotor (1-ATG-KAN-3'-Region) enthält, ersetzte die HindIII-SalI-Polylinkerregion von pCGN739; es entstand pCGN783.

pBrx17 wurde mit BamHI abgebaut und mit HincII teilabge-

baut, wodurch das 1,2 KB-Nitrilasegen-Fragment entstand. Das BamHI-HincII-Fragment wurde in mit BamHI-SmaI abgebauten pCGN566 eingebaut, es entstand das 3,7 KB-Plasmid pBrx25, das das Nitrilasegen-Fragment enthielt.

pCGN566 wurde wie folgt hergestellt: pUC13 (Cm<sup>R</sup>) (Ken Buckley, Dissertation, U.C., San Diego) wurde mit EcoRI und HindIII abgebaut, Polylinker aus pUC18 und pUC19 wurden jeweils in das lineargemachte pUC13 eingebaut, wobei pCGN566 entstand, das einen Chloramphenicolresistenzmarker trägt.

Das Plasmid pBrx25, das das 1,2 KB-Nitrilasegen-Fragment enthält, wurde wie oben beschrieben in E. coli transformiert. Das Plasmid wurde in herkömmlicher Weise isoliert und mit BamHI und EcoRI wiederum zum 1,2 KB-Nitrilasegen-Fragment abgebaut. Das BamHI- und EcoRI-Fragment wurde in mit BamHI und EcoRI abgebautes pCGN46 eingebaut, es entstand das 6,6 KB-Plasmid pBrx27, das das Nitrilasegen-Fragment enthält.

pBrx27 wurde wie oben beschrieben in E. coli transformiert. Das Plasmid wurde in herkömmlicher Weise isoliert und mit XhoI abgebaut, es entstand ein 4,1 KB-Fragment, das den MAS-Promotor, das Bromoxynilgen mit 11 BP der bakteriellen 5'-Region in der übersetzten Sequenz und die ocs-3'-Region enthält. Das 4,1 KB-Fragment wurde in mit SalI abgebautes pCGN783 eingebaut, es entstand das Plasmid pBrx29 mit etwa 31 KB.

Nachweis der Nitrilaseexpression

Die Plasmide pBrx28 und pBrx29 wurden in den Stamm *Agrobacterium tumefaciens* K12 transformiert (Nester, "Ann. Rev. Micro.", 35, S. 531 (1981); Hoekema et al., "Nature", 303, S. 179 (1983)). K12 (pBrx28) und K12 (pBrx29) wurden zur Bildung von Gallen auf Kalanchoe verwendet (Garfinkel, "J. Bacteriol.", 144, S. 732 (1980)).

Etwa 1 g (Frischgewicht) Gallengewebe wurden in flüssigem Stickstoff und einem Puffer, der 0,1 mol/l Tris, pH 7,5, 10 mmol/l EDTA, 0,15 mol/l NaCl, 0,05 % NP-40 (Netzmittel), 25 mg/ml BSA (Rinderserumalbumin), 1 mmol/l DTT und 0,13 µg/ml Leupeptin enthält, gemahlen. Die Proben wurden nach der Zugabe von 0,05 g Polyvinylpyrrolidon (Sigma) homogenisiert, dann bei 15.000 g 15 min bei 4 °C zentrifugiert. 25 µl Antiserum, das durch Injektion von gereinigter Nitrilase in Kaninchen hergestellt wurde, und 250 µl 10 %-ige (Masse/Volumen) Suspension von *S. aureus* (Calbiochem) wurden zu jedem Überstand zugegeben und 16 h bei 4 °C inkubiert. Die Proben wurden dann zentrifugiert, der Niederschlag wurde zweimal mit 20 mmol/l Tris, pH 7,5, 1 mmol/l EDTA, 150 mmol/l NaCl und 0,05 % NP-40 gewaschen. Die Niederschläge wurden in 100 µl 0,125 mol/l Tris, pH 6,8, 4 % SDS (Natriumdodecylsulfat), 20 % Glycerin und 10 % BMe (β-Mercaptoethanol) wieder suspendiert und 2 min auf 90 °C erhitzt. Alle Proben wurden auf 10 %-igem Acrylamidgel der Elektrophorese unterworfen (V.K. Laemmli "Nature", 227, S. 680-685 (1970)). Die wiederaufgelösten Polypeptide wurden auf Nitrozellulosefilter (Schleicher & Schuell) transferiert

(vgl. Burnette, "Anal. Biochem.", 112, S. 195-203 1981)). Die Nitrozellulosefilter (Schleicher & Schuell) wurden dann in BLOTTO (Johnson et al., "Gen. Anal. Technol.", 1, S. 38-42 (1983)) 1 bis 3 h bei 42 °C inkubiert, dann über Nacht bei Raumtemperatur in BLOTTO, das eine 1:50-Lösung des Anti-Nitrilaseserums enthielt, inkubiert. Die Filter wurden 10 min in 20 mmol/l Tris, pH 7,5 und 150 mmol/l NaCl, dann 20 min in dem gleichen Puffer, der jedoch 0,05 % Tween-20 enthielt und weitere 10 min in dem Puffer ohne Tween-20 gewaschen. Es wurde dann BLOTTO, das  $10^6$  cpm/ml  $^{125}\text{I}$ -markiertes Protein A (9  $\mu$  Ci/mg; NEN) enthielt, zu den Filtern zugegeben, die 2 h bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die Filter wurden über Nacht in 50 mmol/l Tris, pH 7,5, 1 mol/l NaCl und 0,4 % Sarkosyl gewaschen. Nach dem Spülen und dem Trocknen wurden die Filter einem Kodak AR-Röntgenfilm bei - 70 °C unter Verwendung eines DuPont-Cronex-Intensivierungsserum ausgesetzt.

Transformation und Regenerierung von Tabakblätter-Scheiben,  
die mit *A. tumefaciens* kokultiviert wurden

Tabakpflanzen wurden unter sterilen Bedingungen (25 °C, 16 h weißes Licht, MS-Medium (1 mg/l IAA (Indoleessigsäure), 0,15 mg/l Kinetin) kultiviert. 3 Wochen alte Pflanzen, die durch Verpflanzen des Haupttriebs erhalten wurden, werden als Gewebespender verwendet. Junge Blätter (bis zum vierten Blatt von oben) wurden ausgewählt, Blattscheiben mit einem Durchmesser von 2 mm wurden ausgestanzt und in Petrischalen (3 cm Durchmesser) in 1 ml MS-Medium mit 1 mg/l IAA eingebracht. Nachdem die Scheiben über Nacht in völliger Dunkel-

heit gehalten wurden, wurde Agrobacterium (A772xpN1 oder pN2)-Zellen ( $10^8$  -  $10^9$ /ml in Pflanzenkulturmedium) diesen Kulturen zugegeben. Die Cokultivierung wurde 13 bis 24 h in der Dunkelheit durchgeführt. Durch dreimaliges Waschen mit MS-Medium ohne Hormone, das jedoch 350 mg/l Cefotaxin (Boehringer, Mannheim) enthielt, wurden die Blattscheiben von Agrobacterium befreit. Die Blattscheiben wurden in Petrischalen mit einem Durchmesser von 9 cm in 10 ml MS-Medium ohne Hormone eingebracht. Petrischalen mit Phytagar (0,6 % Gibco, 350 mg/l Cefotaxin) wurden mit Paraffin verschlossen und unter den gleichen Bedingungen als Gewebespenderpflanzen gehalten. Die Regenerationskeime wurden in den folgenden 2 bis 5 Wochen sichtbar.

Die Pflanzen mit 6 Blättern wurden mit einem direkten Strahl einer Bromoxynillösung auf die eingetopfte Pflanze besprüht. Jeder 10 cm Topf enthielt eine Pflanze und erhielt 2,5 ml Spray. Die Pflanzen wurden in einem Gewächshaus bei 25 °C, 70 % relativer Feuchtigkeit und einer Lichtperiode von 60 h gezüchtet. Das Wachstum wurde 9 Tage nach dem Besprühen durch Zählen der neuen Blätter, die länger als 0,5 cm waren, bestimmt.

Herstellung einer kleinen Untereinheit einer Promotor-Bromoxynilgen-Chimäre von Tabak zur Expression der Bromoxynil-spezifischen Nitrilase in Tabak

Herstellung einer Tabak-ssu-Promotorkassette

Genom-Klone, die die kleine Tabakgen-Untereinheit enthiel-

ten, wurden aus einer EcoRI-Teilgenombibliothek, die aus *Nicotiana tabacum* (Samsun)-DNA hergestellt wurde, isoliert. Die Klone wurden unter Verwendung eines PstI-DNA-Segments mit 740 BP eines Klon einer kleinen Erbsen-cDNA-Untereinheit ausgewählt (Broglie et al., "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", 78, S. 7304-7308 (1981)). Ein 3,4-KB-EcoRI-Fragment, das eine Tabak-codierende Region und eine 5'-flankierende Sequenz enthielt, wurde aus einem Charon-32-Lambda-Phasenklon (3-8) in M13mp18 geklont (Yanisch-Perron et al., "Gene", 33, S. 103-119 (1985)). Dieser Unterklon wurde mit NSUE2018 bezeichnet. Die Lokalisierung der TATA-Box (Promotor) und des mutmaßlichen ATG-Startcodons für das Protein der kleinen Untereinheit wurde durch DNA-Sequenzierung bestimmt. Eine einstrangige DNA-Schablone wurde aus NSUE2018 hergestellt und zu einem Ring eines 25-basigen einstrangigen synthetischen Oligomers (5'TGTTAATTACACTTTAAGACAGAAA3') geschlossen. Diese Sequenz ist zu den 25 Basen unmittelbar am 5'-Ende des mutmaßlichen ATG der kleinen Tabakgen-Untereinheit komplementär. Der Primer wurde zur Herstellung von doppelstrangiger DNA unter Verwendung des Klenow-Fragments von DNA-Polymerase I erweitert, mit HindIII zu einem doppelstrangigen DNA-Fragment mit einem stumpfen Ende an einem Ende des Primers und dem HindIII-Überhang am anderen Ende abgebaut. pUC18 wurde mit SmaI und HindIII abgebaut, das oben hergestellte doppelstrangige DNA-Fragment wurde in den Polylinker eingebaut, wobei ein 4,1 KB-Plasmid mit der Bezeichnung pCGN625 entstand. pCGN625 wurde mit HindIII abgebaut, mit dem Klenow-Fragment am stumpfen Ende verbunden, mit EcoRI abgebaut und in mit EcoRI-SmaI gespaltenes pUC18 eingebaut; es entstand

ein 4,1 KB-Plasmid pCGN627. Ein 6,3 KB-DNA-Segment wurde erhalten, das ein BamHI-PstI-Fragment aus pACYC177 (Chang und Cohen, "J. Bacteriol", 134, S. 1141-1156 (1978)) enthielt, das an der PstI-Stelle an ein PstI-EcoRI-Fragment gebunden ist, das die ocs-3'-Region, 12823 BP (EcoRI) bis 10069 BP (PstI) umfaßt (Barker et al., "Plant Molec. Biol.", 2, S. 335-350 (1984)). Das 6,3 KB-DNA-Segment wurde in mit BamHI und EcoRI abgebautes pCGN627 eingeführt, so daß die ocs-3'-Region zu dem Tabak-ssu-Fragment benachbart ist; es entstand ein 7,7 KB-Plasmid pCGN630.

Das pCGN630-Plasmid wurde durch Abbau mit BamHI, Verknüpfen am stumpfen Ende mit dem Klenow-Fragment, Ringschluß, Abbau mit KpnI, Verbinden am stumpfen Ende mit T4-Polymerase und Einbau von BamHI-Linkern, um eine BamHI-Stelle zur Verfügung zu stellen, manipuliert. Das entstandene Plasmid pCGN1509 wurde mit BglII gespalten, am stumpfen Ende mit Klenow-Polymerase verbunden und mit HindIII-Linkern verknüpft. Das entstandene Plasmid pCGN1510 hat eine HindIII-Stelle in der ocs-3'-Region und eine HindIII-Stelle, die benachbart und außerhalb der Tabak-ssu-Region ist. pCGN1510 wurde dann mit BamHI und SstI abgebaut, wobei die Region zwischen der ssu-Region und der ocs-3'-Region zerschnitten wird, und ein BamHI-SstI-Fragment aus pBrx25 so eingebaut, so daß es zwischen und in der richtigen Orientierung der ssu-Promotorregion und der ocs-3'-Endregion ist. Das entstandene 8,9 KB-Plasmid wurde mit pBrx36 bezeichnet.

pBrx36 wurde mit HindIII abgebaut und in mit HindIII gespaltenes pCGN783 zu pBrx39 und pBrx40 eingebaut, wobei das

Nitrilasegen in entgegengesetzter bzw. gleicher Transkriptionsrichtung wie das Kanamycingen ist.

Die Plasmide wurden in *A. tumefaciens* LBA4404 transformiert und dann mit zweikeimblättrigen Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* cv. "Xanthi") kokultiviert. Die kanamycinresistenten Schößlinge wurden in herkömmlicher Weise in Tabakpflanzen regeneriert.

Phenotyp von transgenen Tabakpflanzen, die das Bromoxynil-spezifische Nitrilasegen exprimieren.

Blattgewebe aus transformierten Tabakpflanzen (5 bis 6 Blätter) exprimierten das Nitrilasegen (bestimmt nach herkömmlicher Western-Analyse). Ein 5 mm großes Blattstück aus oberflächensterilisierten (10 % Hypochlorit, mit Wasser gewaschen) Blättern wurden in einem Bromoxynil enthaltenden Medium unter photoautotrophen Bedingungen suspendiert. Die verwendeten Medien waren MS-Salze, die 0,93 mg/l Naphthyl-essigsäure und 0,11 mg/l Benzylaminopurin und unterschiedliche Mengen an Bromoxynil enthielten. Die Bromoxynil-Konzentration schwankte von  $10^{-3}$  bis  $10^{-6}$  mol/l bei 0,1 Verdünnungen. Die photoautotrophen Bedingungen waren 5 %  $\text{CO}_2$ , 10 %  $\text{O}_2$  und 85 %  $\text{N}_2$ . Kontroll-Tabakblattabschnitte, die nicht transformiert worden sind, wurden mit  $10^{-6}$  mol/l Bromoxynil gebleicht (gehemmt). Im Gegensatz dazu waren transformierte Blattabschnitte, die die Bromoxynil-spezifische Nitrilase aus den Plasmiden pBrx39 und pBrx40 exprimierten, gegenüber  $10^{-5}$  bzw.  $10^{-4}$  mol/l Bromoxynil resistent.

Phenotyp von transgenen Tomatenpflanzen, die das Bromoxynil-spezifische Nitrilasegen exprimieren.

Die Cokultivierung von zweikeimblättrigen Tomatenpflänzchen (*Lycopersicon esculentum* cv. UC828) wurde, wie für Tabak beschrieben, durchgeführt, Kanamycin-Schößlinge wurden regeneriert. Das Blattgewebe aus transformierten Tomatenpflanzen (7 bis 10 Blätter) exprimierten das Nitrilaseprotein (bestimmt durch Standard-Western-Analyse). Etwa 5 mm große Blattabschnitte aus oberflächensterilisierten (10 % Hypochlorit, mit Wasser gewaschen) Blättern wurden in einem Bromoxynil enthaltenden Medium bei verschiedenen Konzentrationen unter photoautotrophen Bedingungen suspendiert. Die Medien waren MS-Salze, die 2 mg/l 2,4-Dichloressigsäure, 1 mg/l Isopentyladenin, 100 mg/l Myoinosit und  $10^{-5}$  oder  $10^{-6}$  mol/l Bromoxynil enthielten. Es wurden die gleichen photoautotrophen Bedingungen, wie oben für Tabak beschrieben, verwendet. Kontrollblattabschnitte, die nicht transformiert worden sind, wurden mit  $10^{-6}$  mol/l Bromoxynil gebleicht, während transformierte Pflanzen, die das Bromoxynil-spezifische Nitrilasegen aus pBrx29 exprimierten, gegenüber  $10^{-5}$  mol/l Bromoxynil resistent waren. Transgene Tomatenpflanzen (10 bis 20 Blätter) wurden mit einem handelsüblichen Bromoxynilpräparat (BUCTRIL) besprüht und waren bei einer Konzentration von 0,22 kg/0,4 ha (0,5 lb/acre) resistent.

### Herstellung einer modifizierten Nitrilase mit einem substituierten C-Ende

Das Plasmid pBrx9 wurde mit SphI abgebaut und wieder zum Ring geschlossen, so daß eine Deletion in der Codierregion am C-Ende des Nitrilasegens entstand. Die DNA-Sequenz aus pUC18 ist im Leseraster mit der 3'-SphI-Stelle der Nitrilase-Codierregion, wobei etwa 10 Codons zu einem TGA-Codon aus pUC18 zugefügt werden.

Die Anwesenheit der zusätzlichen 10 Codons ist zufällig und bestätigt die Tatsache, daß diese Codons entfernt werden können, ohne daß die Nitrilaseaktivität wesentlich beeinflußt wird, wobei eine verkürzte Nitrilase entsteht.

Im folgenden wird die Sequenz mit den vorausgesagten Aminosäuren der am C-Ende modifizierten Nitrilase (nit-11) angegeben:

92 119  
 ATG GAC ACC ACI TTC AAA GCA GCC GCT GTT CAG GCC GAA CCG GTA TGG ATG GAT  
 MET Asp Thr Thr Phe Lys Ala Ala Ala Val Gln Ala Glu Pro Val Trp MET Asp

146 173  
 GCC GCT GCA ACA GCC GAT AAG ACC GTG ACG CTA GTA GCT AAA GCC GCA GCG GCT  
 Ala Ala Ala Thr Ala Asp Lys Thr Val Thr Leu Val Ala Lys Ala Ala Ala Ala

200 227  
 GGC GCG CAG CTC GTC GCA TTT CCC GAA TTG TGG ATT CCG GGC TAC CCA GGA TCC  
 Gly Ala Gln Leu Val Ala Phe Pro Glu Leu Trp Ile Pro Gly Tyr Pro Gly Phe

254 281  
 ATG CTC ACG CAC AAC CAA ACC GAA ACC CTA CCA TTC ATC ATT AAA TAC CGC AAG  
 MET Leu Thr His Asn Gln Thr Glu Thr Leu Pro Phe Ile Ile Lys Tyr Arg Lys

308 335  
 CAG GCA ATC GCC GCC GAT GGA CCA GAA ATC GAA AAA ATT CGC TCC GCG GCT CAG  
 Gln Ala Ile Ala Ala Asp Gly Pro Glu Ile Glu Lys Ile Arg Cys Ala Ala Gln

362 389  
 GAG CAT AAC ATT GCG CTC TCC TTT GGG TAC AGC GAA CCG GCT GGC CGT ACG CTC  
 Glu His Asn Ile Ala Leu Ser Phe Gly Tyr Ser Glu Arg Ala Gly Arg Thr Leu

416 443  
 TAC ATG TCA CAA ATG CTT ATC GAT GCC GAT GGC ATC ACC AAA ATT CGT CGT CGA  
 Tyr MET Ser Gln MET Leu Ile Asp Ala Asp Gly Ile Thr Lys Ile Arg Arg Arg

470 497  
 AAG CTC AAA CCA ACC CGC TTT GAA CGA GAA CTC TTT GGC GAA GGT GAC GGA TCG  
 Lys Leu Lys Pro Thr Arg Phe Glu Arg Glu Leu Phe Gly Glu Gly Asp Gly Ser

524 551  
 GAC TTA CAG GTC GCC CAA ACT AGC GTT GGT CCG GTG GGT GCC CTC AAC TCC GCG  
 Asp Leu Gln Val Ala Gln Thr Ser Val Gly Arg Val Gly Ala Leu Asn Cys Ala

578 605  
 GAG AAT TTG CAG TCG CTA AAC AAG TTT GCG CTT GCT GCC GAG GGT GAA CAG ATA  
 Glu Asn Leu Gln Ser Leu Asn Lys Phe Ala Leu Ala Ala Glu Gly Glu Gln Ile

632 659  
 CAT ATC TCC GCC TGG CCA TTC ACG CTT GGA AGC CCT GTG CTC CTC GGA GAC TCC  
 His Ile Ser Ala Trp Pro Phe Thr Leu Gly Ser Pro Val Leu Val Gly Asp Ser

686 713  
 ATC GGC GCC ATC AAC CAG GTC TAC GCG GCC GAG ACG GGG ACC TTC GTT CTC ATG  
 Ile Gly Ala Ile Asn Gln Val Try Ala Ala Glu Thr Gly Thr Phe Val Leu MET

740 767  
 TCG ACG CAG GTG GTT GGA CCG ACC GGC ATC GCC GCC TTC GAG ATC GGA GAC AGG  
 Ser Thr Gln Val Val Gly Pro Thr Gly Ile Ala Ala Phe Glu Ile Glu Asp Arg

794 821  
 TCA AAC CCG AAT CAG TAT CTT GGT GGT GGG TAC GCG CCG ATC TAC GGG CCT GAC  
 Tyr Asn Pro Asn Gln Tyr Leu Gly Gly Gly Tyr Ala Arg Ile Tyr Gly Pro Asp

	848	875
ATG CAG TTG AAG AGC AAG TCG TTG TCA CCG ACC GAA GAG GGC ATC GTC TAC GCC		
MET Gln Leu Lys Ser Lys Ser Leu Ser Pro Thr Glu Glu Gly Ile Val Tyr Ala		
	902	929
GAG ATC GAC CTG TCG ATG CTT GAG GCA GCA AAG TAC TCG CTC GAT CCC ACG GGC		
Glu Ile Asp Leu Ser MET Leu Glu Ala Ala Lys Tyr Ser Leu Asp Pro Thr Gly		
	956	983
CAC TAT TCG CGC CCT GAT GTG TTC AGC GTG TCG ATT AAC CGG CAA CGG CAG CCT		
His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Phe Ser Val Ser Ile Asn Arg Gln Arg Gln Pro		
	1010	1037
GCG GTG TCA GAA GTT ATC GAC TCA AAC GGT GAC GAG GAC CCG AGA GCA GCA TGC		
Ala Val Ser Glu Val Ile Asp Ser Asn Gly Asp Glu Asp Pro Arg Ala Ala Gys		
	1064	1091
AAG CTT GGC ACT GGC CGT TTT ACA ACG TCG TGA CTG GGA AAA CCC TGG CGT TAC		
Lys Leu Gly Thr Gly Arg Phe Thr Thr Ser . Leu Gly Lys Pro Trp Arg Tyr		
	513	540
TTA CAG GTC GCC CAA ACT AGC GTT GGT CGG GTG GGT GCC CTC AAC TGC GCG GAG		
Leu Gln Val Ala Gln Thr Ser Val Gly Arg Val Gly Ala Leu Asn Cys Ala Glu		
	567	594
AAT TTG CAG TCG CTA AAC AAG TTT GCG CTT GCT GCC GAG GGT GAA CAG ATA CAT		
Asn Leu Gln Ser Leu Asn Lys Phe Ala Leu Ala Ala Glu Gly Glu Gln Ile His		
	621	648
ATC TCC GCC TGG CCA TTC ACG CTT GGA AGC CCT GTG CTC GTC GGA GAC TCC ATC		
Ile Ser Ala Trp Pro Phe Thr Leu Gly Ser Pro Val Leu Val Gly Asp Ser Ile		
	675	702
GGC GCC ATC AAC CAG GTC TAC GCG GCC GAG ACG GGG ACC TTC GTT CTC ATG TCG		
Gly Ala Ile Asn Gln Val Tyr Ala Ala Glu Thr Gly Thr Phe Val Leu MET Ser		
	729	756
ACG CAG GTG GTT GGA CCG ACC GGC ATC GCC GCC TTC GAG ATC GAA GAC AGG TAC		
Thr Gln Val Val Gly Pro Thr Gly Ile Ala Ala Phe Glu Ile Glu Asp Arg Tyr		
	783	810
AAC CCG AAT CAG TAT CTT GGT GGT GGG TAC GCG CGG ATC TAC GGG CCT GAC ATG		
Asn Pro Asn Gln Tyr Leu Gly Gly Gly Tyr Ala Arg Ile Tyr Gly Pro Asp MET		
	837	864
CAG TTG AAG AGC AAG TCG TTG TCA CCG ACC GAA GAG GGC ATC GTC TAC GCC GAG		
Gln Leu Lys Ser Lys Ser Leu Ser Pro Thy Glu Glu Gly Ile Val Tyr Ala Glu		
	891	918
ATC GAC CTG TCG ATG CTT GAG GCA GCA AAG TAC TCG CTC GAT CCC ACG GGC CAC		
Ile Asp Leu Ser MET Leu Glu Ala Ala Lys Tyr Ser Leu Asp Pro Thr Gly His		
	945	972
TAT TCG CGC CCT GAT GTG TTC AGC GTG TCG ATT AAC CGG CAA CGG CAG CCT GCG		
Tyr Ser Arg Pro Asp Val Phe Ser Val Ser Ile Asn Arg Gln Arg Gln Pro Ala		

- 50 -

999 1026  
 GTG TCA GAA GTT ATC GAC TCA AAC GGT GAC GAG GAC CCG AGA GCA GCA TGC GAG  
 Val Ser Glu Val Ile Asp Ser Asn Gly Asp Glu Asp Pro Arg Ala Ala Cys Glu

1053 1080  
 CCC GAC GAG GGG GAT CGT GAG GTC GTA ATC TCT ACG GCA ATA GGG GTT CTA CCC  
 Pro Asp Glu Gly Asp Arg Glu Val Val Ile Ser Thr Ala Ile Gly Val Leu Pro

1107 1134  
 CGT TAT TGC GGA CAT TCC TAA TAA AAA GAG ACA CGT TGT ACC AAA GGG GTG TTC  
 Arg Tyr Cys Gly His Ser . . Lys Glu Thr Arg Cys Thr Lys Gly Val Phe

1161 1188  
 ATG TCC AGA CGC AGA AAA TAT AGC CCA GAG TTA AAA CGC GAA GCC ATC GCT TTA  
 MET Ser Arg Arg Arg Lys Try Ser Pro Glu Leu Lys Arg Glu Ala Ile Ala Leu

1215

ACC CGT C  
 Thr Arg His

### Herstellung einer modifizierten Nitrilase mit einem substituierten N-Ende

Das Plasmid pBrx9 wurde mit BamH1 abgebaut und anschließend mit Bal31 etwa 5 min zur Entfernung von etwa 51 Nukleotiden zerschnitten. Das Enzym wurde inaktiviert, die zerschnittene lineare DNA-Sequenz wurde mit BamH1-Linkern verbunden, mit BamH1 abgebaut und unter Verknüpfungsbedingungen zum Ring geschlossen. Das entstandene Plasmid pBrx15 enthielt etwa 5,1 KB und eine geringere Anzahl an Codons am 5'-Ende. pBrx15 wurde mit HincI teilabgebaut, so daß es an der HincI-Stelle stromabwärts von der Codierregion für die Nitrilase zerschnitten wurde, und mit BamH1 vollständig abgebaut, wobei ein Fragment entstand, in dem die Codierregion für die Nitrilase am 5'-Ende verkürzt war. Dieses Fragment wurde in pCGN566 eingebaut, das vollständig mit BamH1 und SmaI abgebaut worden war; dabei entstand das Plasmid pBrx23 mit 3,7 KB. Das Plasmid pCGN566 ist ein Derivat von pUC13 mit Polylinkern aus pUC18 und pUC19 und einem Chloramphenicol-Resistenzgen. Das Fragment aus pBrx15 wird in das Leseraster mit einem stromaufwärts gerichteten Anfangscodon eingebaut, dabei ersetzen 17 von der pUC19-Sequenz codierte Aminosäuren die Aminosäuren der natürlich vorkommenden Nitrilase.

Aufgrund dieser Sequenz behält die Nitrilase ihre Aktivität sowohl mit einer längeren Aminosäuresequenz am N-Ende als auch nach Verkürzung dieser N-terminalen Sequenz oder Substitution der natürlich vorkommenden Aminosäure der N-terminalen Sequenz mit anderen Aminosäuren.

Im folgenden wird die Sequenz der N-terminal-modifizierten  
Nitrilase (nit-23) angegeben:

- 53 -

27 54  
 ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC TTG CAT GCC TGC AGG TCG ACT CTA GAG GAT CCG  
 MET Thr MET Ile Thr Pro Ser Leu His Ala Cys Arg Ser Thr Leu Glu Asp Pro

81 108  
 GAC ACC ACT TTC AAA GCA GCC GCT GTT CAG GCC GAA CCG GTA TGG ATG GAT GCC  
 Asp Thr Thr Phe Lys Ala Ala Ala Val Gln Ala Glu Pro Val Trp MET Asp Ala

135 162  
 GCT GCA ACA GCC GAT AAG ACC GTG ACG CTA GTA GCT AAA GCC GCA GCG GCT GGC  
 Ala Ala Thr Ala Asp Lys Thr Val Thr Leu Val Ala Lys Ala Ala Ala Ala Gly

189 216  
 GCG CAG CTC GTC GCA TTT CCC GAA TTG TGG ATT CCG GGC TAC CCA GGA TTC ATG  
 Ala Gln Leu Val Ala Phe Pro Glu Leu Trp Ile Pro Gly Tyr Pro Gly Phe MET

243 270  
 CTC ACG CAC AAC CAA ACC GAA ACC CTA CCA TTC ATC ATT AAA TAC CGC AAG CAG  
 Leu Thr His Asn Gln Thr Glu Thr Leu Pro Phe Ile Ile Lys Tyr Arg Lys Gln

297 324  
 GCA ATC GCC GCC GAT GGA CCA GAA ATC GAA AAA ATT CGC TGC GCG GCT CAG GAG  
 Ala Ile Ala Ala Asp Gly Pro Glu Ile Glu Lys Ile Arg Cys Ala Ala Gln Glu

351 378  
 CAT AAC ATT GCG CTC TCC TTT GGG TAC AGC GAA CGG GCT GGC CGT ACG CTC TAC  
 His Asn Ile Ala Leu Ser Phe Gly Tyr Ser Glu Arg Ala Gly Arg Thr Leu Tyr

405 432  
 ATG TCA CAA ATG CTT ATC GAT GCC GAT GCC ATC ACC AAA ATT CGT CGT CGA AAG  
 MET Ser Gln MET Leu Ile Asp Ala Asp Gly Ile Thr Lys Ile Arg Arg Arg Lys

459 486  
 CTC AAA CCA ACC CGC TTT GAA CGA GAA CTC TTT GGC GAA GGT GAC GGA TCG GAC  
 Leu Lys Pro Thr Arg Phe Glu Arg Glu Leu Phe Gly Glu Gly Asp Gly Ser Asp

513 540  
 TTA CAG GTC GCC CAA ACT AGC GTT GGT CCG GTG GGT GCC CTC AAC TGG GCG GAG  
 Leu Gln Val Ala Gln Thr Ser Val Gly Arg Val Gly Ala Leu Asn Cys Ala Glu

567 594  
 AAT TTG CAG TCG CTA AAC AAG TTT GCG CTT GCT GCC GAG GGT GAA CAG ATA CAT  
 Asn Leu Gln Ser Leu Asn Lys Phe Ala Leu Ala Ala Glu Gly Glu Gln Ile His

621 648  
 ATC TCC GCC TGG CCA TTC ACG CTT GGA AGC CCT GTG CTC GTC GGA GAC TCC ATC  
 Ile Ser Ala Trp Pro Phe Thr Leu Gly Ser Pro Val Leu Val Gly Asp Ser Ile

675 702  
 GGC GCC ATC AAC CAG GTC TAC GCG GCC GAG ACG GGG ACC TTC GTT CTC ATG TCG  
 Gly Ala Ile Asn Gln Val Tyr Ala Ala Glu Thr Gly Thr Phe Val Leu MET Ber

729 756  
 ACG CAG GTG GTT GGA CCG ACC GGC ATC GCC GCC TTC GAG ATC GAA GAC AGG TAC  
 Thr Gln Val Val Gly Pro Thr Gly Ile Ala Ala Phe Glu Ile Glu Asp Arg Tyr

783 810  
 AAC CCG AAT CAG TAT CTT GGT GGT GGG TAC GCG CCG ATC TAC GGG CCT GAC ATG  
 Asn Pro Asn Gln Tyr Leu Gly Gly Gly Tyr Ala Arg Ile Tyr Gly Pro Asp MET

837 864  
 CAG TTG AAG AGC AAG TCG TTG TCA CCG ACC GAA GAG GGC ATC GTC TAC GCC GAG  
 Gln Leu Lys Ser Lys Ser Leu Ser Pro Thr Glu Glu Gly Ile Val Tyr Ala Glu

891 918  
 ATE GAC CTG TCG ATG CTT GAG GCA GCA AAG TAC TCG CTC GAT CCC ACG GGC CAC  
 Ile Asp Leu Ser MET Leu Glu Ala Ala Lys Tyr Ser Leu Asp Pro Thr Gly His

945 972  
 TAT TCG CGC CCT GAT GTG TTC AGC GTG TCG ATT AAC CGG CAA CGG CAG CCT GCG  
 Tyr Ser Arg Pro Asp Val Phe Ser Val Ser Ile Asn Arg Gln Arg Gln Pro Ala

999 1026  
 GTG TCA GAA GTT ATC GAC TCA AAC GGT GAC GAG GAC CCG AGA GCA GCA TGC GAG  
 Val Ser Glu Val Ile Asp Ser Asn Gly Asp Glu Asp Pro Arg Ala Ala Cys Glu

1053 1080  
 CCC GAC GAG GGG GAT CGT GAG GTC GTA ATC TCT ACG GCA ATA GGG GTT GTA CCC  
 Pro Asp Glu Gly Asp Arg Glu Val Val Ile Ser Thr Ala Ile Gly Val Leu Pro

1107 1134  
 CGT TAT TGC GGA CAT TCC TAA TAA AAA GAG ACA CGT TGT ACC AAA GGG GTG TTC  
 Arg Tyr Cys Gly His Ser Lys Glu Thr Arg Cys Thr Lys Gly Val Phe

1161 1188  
 ATG TCC AGA CGC AGA AAA TAT AGC CCA GAG TTA AAA CGC GAA GCC ATC GCT TTA  
 MET Ser Arg Arg Arg Lys Tyr Ser Pro Glu Seu Lys Arg Glu Ala Ile Ala Leu

1215  
 ACC CGT C  
 Thr Arg His

Reinigung des Wildtyps und der modifizierten Nitrilase

Nitrilase wurde aus E. coli MM 294-Zellen in der stationären Phase, die pBrx9, pBrx11 oder pBrx28-Plasmide enthielten, erhalten. Die Kulturen wurden unter Ampicillin-Selektion gezüchtet, bis die Bestimmung auf Nitrilase in den Gesamtzellen einen  $OD_{640}$ -Wert von etwa 2,0 zeigten. Die Kulturen wurden bei 8000 g 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden in 0,1 mol/l Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4 gewaschen, zu Kügelchen geformt, getrocknet und bei - 20 °C gefroren. Die Kügelchen wurden bei 4 °C aufgetaut und in 40 ml 50 mol/l Kaliumphosphatpuffer, 1 mmol/l Dithiothreitol und 0,1 mmol/l EDTA (KDE) wieder suspendiert. Die Zellsuspension wurde durch eine französische Presse geleitet und bei 60.000 g 40 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand (Rohextrakt) wurde mit KDE-Puffer auf eine Proteinkonzentration von 12 mg/ml (Fraktion I) verdünnt. Der Rohextrakt wurde mit Ammoniumsulfat fraktioniert, die 25 bis 35 %-Fraktion (Fraktion II) enthielt 85 % der Nitrilaseaktivität. Diese Fraktion wurde in 10 ml KDE-Puffer suspendiert und ausgiebig gegen diesen Puffer dialysiert.

Die Fraktion II wurde weiter in einer DEAE-Sephadex A-50-Säule (4,9 cm<sup>2</sup> x 40 cm), die in KDE-Puffer equilibriert worden ist, gereinigt. Der Nitrilasegipfel wurde mit einem NaCl-Gradienten von 0,1 bis 0,4 mol/l in KDE-Puffer eluiert. Die aktiven Fraktionen wurden gesammelt (Fraktion III), mit Ammoniumsulfat ausgefällt und in 25 mmol/l Histidin, pH 6,2, dialysiert. Eine Pharmacia-Chromatofokussiersäule (1,75 cm<sup>2</sup> x 20 cm) wurde mit Polypuffer 94 Austausch-

harz (PBE 94), das mit 25 mmol/l Histidin, pH 6,2, equilibriert worden ist, hergestellt. Die Säule wurde zuerst mit Polypuffer 74, pH 4,0 zur Herstellung eines pH-Gradienten von 6 bis 4 gewaschen, dann wurde das Enzym mit 1 mmol/l NaCl eluiert. Der die aktiven Enzymfraktionen enthaltende Gipfel wurde mit Ammoniumsulfat ausgefällt und in KDE (Fraktion IV) dialysiert. SDS-PAGE auf einem 11,25 %-igen Gel zeigte eine starke Bande bei einer Molekülmasse von etwa 37.000 und eine schwache Verunreinigung bei einer Molekülmasse von etwa 70.000.

Die Überprüfung mit dem Densitometer zeigt, daß das Nitrilasepräparat der Fraktion IV zu 99 % homogen ist.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Reinigung und die Eigenschaften der gereinigten Nitrilaseprodukte angegeben.

Vergleich der Reinigung und der Eigenschaften des  
Wildtyps und der modifizierten Bromoxynil-spezifischen  
Nitrilasen

	nit-wt	nit-11	nit-23
Ammoniumsulfat-Fraktion	25-35 %	10-25 %	20-35 %
DEAE-Sephadex-Elution	270 mmol/l	150 mmol/l	290 mmol/l
Chromatofokussierende Elution, pH6-4-Gra- dient, mit 1 mol/l NaCl gewaschen	1 mol/l NaCl	pH 4,6	1 mol/l NaCl
Spezifische Aktivität	25,7	55	19,7
Reinigung (x)	10,3	16,4	35,8
K <sub>m</sub> (mol/l)	0,31	0,05	0,11
V <sub>max</sub> (µmol/min/mg)	15	36	9
Aktive Enzymform	dimer	multimer	dimer

Nach den oben angegebenen Verfahren können Pflanzen erhalten werden, die Bromoxynil-resistent sind und im Feld in Gegenwart von Bromoxynil verwendet werden können, ohne daß ihr Wachstum beeinträchtigt wird.

Erfindungsgemäß ist es nun möglich, die Pflanzen dadurch zu verbessern, daß sie gegenüber Herbiziden und insbesondere gegenüber spezifischen Benzonitril-Herbiziden resistent gemacht werden. D.h., das die Nitrilase codierende Gen kann in einen Pflanzenwirt eingeführt werden, wodurch das Gen exprimiert wird und der Pflanze Benzonitril-Resistenz verleiht. Zusätzlich kann das Enzym durch Klonen des Gens in einem geeigneten bakteriellen Wirt, in dem das Enzym expri-

miert wird, produziert werden. Enzyme mit einer zu überprüfenden Aktivität finden vielerlei Anwendungen, z.B. in Versuchen zum Nachweis bestimmter Substanzen oder des Benzonitrilssubstrats. Außerdem können die Enzyme und die die Enzyme exprimierenden Bakterien zur Entfernung der Benzonitril-Herbizide aus verunreinigten Böden eingesetzt werden.

Obwohl die Erfindung eingehend erläutert und die Beispiele zum Verständnis angegeben worden sind, können gewisse Änderungen und Modifikationen innerhalb des Schutzzumfangs der Ansprüche erfolgen.

E. coli MM294 (pBrx5) wurde bei A.T.C.C. am 22. Januar 1986 unter der Hinterlegungsnummer 53435 hinterlegt.

E. coli MM294 (pBrx11) wurde bei A.T.C.C. am 18. Juni 1987 unter der Hinterlegungsnummer 67441 hinterlegt.

E. coli MM294 (pBrx23) wurde bei A.T.C.C. am 18. Juni 1987 unter der Hinterlegungsnummer 67442 hinterlegt.