Beschreibung

Phosphinothricin (PTC, 2-Amino-4-methylphosphinobuttersäure) ist ein Glutaminsynthetase-Inhibitor. PTC ist ein "Baustein" des Antibiotikums Phosphinothricyl-alanyl-alanin. Dieses Tripeptid (PTT) ist aktiv gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien und auch gegen den Pilz Botrytis cinerea (Bayer et al., Helv. Chim. Acta 55 (1972) 224). PTT wird von dem Stamm Streptomyces viridochromogenes Tü 494 (DSM 40736, DSM 4112) produziert.

Aus der Deutschen Patentschrift 2 717 440 ist es bekannt, daß PTC als Totalherbizid wirkt. In der veröffentlichten PCT-Anmeldung WO 86/02097 sind Pflanzen beschrieben, deren Resistenz gegen PTC darauf zurückzuführen ist, daß sie Glutaminsynthetase überproduzieren. Solche Überproduktionen, beispielsweise infolge einer Genamplifikation, bergen jedoch die Gefahr der Instabilität in sich. Im Falle einer solchen Instabilität ginge also die Überproduktion an Glutaminsynthetase zurück und die kompetitive Inhibitorwirkung des PTC käme wieder zum Zuge.

Die Erfindung, die in den Patentansprüchen definiert ist, bezieht sich demgegenüber auf ein Resistenzgen gegen PTC und seine Verwendung zur Herstellung PTC-resistenter Pflanzen. Darüber hinaus kann dieses Gen auch als Resistenz-Marker Verwendung finden. Weiterhin eignet sich das Gen zur selektiven N-Acetylierung der L-Form von racemischem PTC.

Das erfindungsgemäße Resistenzgen gegen PTC ist erhältlich aus der Gesamt-DNA von auf PTT-Resistenz selektiertem Streptomyces viridochromogenes DSM 4112 durch Schneiden mit BamHI, Klonieren eines 4,0 kb großen Fragments und Selektion auf PTT-Resistenz. Die Restriktionskarte (Figur 1) charakterisiert dieses 4,0 kb-Fragment näher.

Durch Klonieren von Teilbereichen dieses 4 kb-Fragmentes wurde die Lage des Codierbereichs näher eingegrenzt. Hierbei zeigte sich, daß das Resistenzgen auf dem 1,6 kb SstII-SstI-Fragment (Positionen 0,55 bis 2,15 in Fig. 1) liegt. Durch Verdauung mit BglII wird das 0,8 kb große Fragment gewonnen, das nach Einbau in ein Plasmid und Transformation von S. lividans PTT-Resistenz vermittelt. Diese Resistenz ist durch die N-Acetylierung von PTC bedingt.

Die Sequenzierung nach Maxam und Gilbert des 0,8 kb-Fragments ergibt die DNA-Sequenz I (Anhang). Aus den offenen Leserahmen dieser Sequenz läßt sich die Lage des Resistenzgens ermitteln (ab Position 258). Das Ende des Gens liegt beim vorletzten der wiedergegeben Nucleotide (Position 806), d. h. das letzte Nucleotid (Position 807), ist der Beginn des Stop-Codons.

In der DNA-Sequenz I ist die "Shine-Dalgarno-Sequenz" durch Unterstreichen hervorgehoben, ebenso das als Startcodon wirkende GTG. Der maßgebliche Leserahmen ist also in der obersten Zeile ausgedruckt.

Die DNA-Sequenz II zeigt die Restriktionsschnittstellen innerhalb des sequenzierten Gens. Enzyme, die die Sequenz mehr als sechsmal schneiden, sind nicht angegeben.

Das Antibiotikum PTT wird von Bakterien aufgenommen und zu PTC abgebaut. Dieses inhibiert bei Bakterien ebenfalls die Glutaminsynthetase, so daß die Bakterien an Glutaminmangel sterben. PTT-produzierende Bakterien sollten daher einen Mechanismus besitzen, der sie vor der Wirkung des PTT schützt, also entweder die Wiederaufnahme des produzierten PTT verhindert oder eine Modifikation des Abbauproduktes PTC ermöglicht. Überraschenderweise ist der PTT-Produzent S. viridochromogenes DSM 4112 aber gegen sein eigenes Antibiotikum sensitiv. Unerwarteterweise gelang es aber, durch Selektion auf PTT-Resistenz mit der überraschend hohen Rate von etwa 10^{-5} Selektanten zu finden, die gegen PTT resistent sind und auch das Untergrundwachstum der benachbarten Kolonien unterdrücken.

Aus der DNA dieser Selektanten wurde eine Genbank angelegt, indem die DNA isoliert, mit BamHI gespalten und in einen Streptomycetenvektor ligiert wurde. Das Ligationsgemisch wurde in den handelsüblichen Stamm S. lividans TK 23 transformiert, wobei je 1 µg Ligationsgemisch etwa 5000 bis 10000 Transformanten mit einem Insert von etwa 1 bis 5 kb erhalten wurden. Unter den Transformanten finden sich PTT-resistente S. lividans-Stämme. Durch Isolierung des Plasmids und Retransformation in S. lividans konnte gezeigt werden, daß die Resistenz plasmidcodiert ist. Das für die Resistenz verantwortliche Gen liegt auf einem 4 kb-BamHI-Fragment (Figur 1). Der Codierbereich ist auf dem 0,8 kb BglII-Fragment lokalisiert. Das BamHI-Fragment enthält keine Schnittstellen für die Enzyme ClaI, EcoRI, EcoRV, HindIII, HpaI, KpnI, PvuI, PvuII und XhoI.

Der Vergleich mit der Restriktionskarte eines nicht näher charakterisierten Resistenzgens aus S. hygroscopicus FERM BP-130/ATCC 21705 (Europäische Patentanmeldung mit der Veröffentlichungsnummer 0 173 327, Figur 7) zeigt, daß das erfindungsgemäße Resistenzgen von dem bekannten Gen verschieden ist, welches auf der Suche nach den PTT-Biosynthesegenen gefunden wurde.

Durch Inkubation von Zellextrakten von S. viridochromogenes DSM 4112 und S. lividans TK 23 einerseits und der PTT-resistenten S. viridochromogenes-Selektante und einer plasmidtragenden S. lividans-Transformante andererseits mit PTC und Acetyl-Coenzym A konnte gezeigt werden, daß die letztgenannten Zellen eine acetylierende Aktivität zeigen. Chromatographische Befunde zeigen, daß die Acetylierung an der Aminogruppe erfolgt.

Da auch in E. coli eine PTT-Resistenz festgestellt werden konnte und der Resistenzmechanismus somit auch in Gramnegativen Bakterien funktioniert, kann eine Resistenz auf Grund von Transportphänomenen ausgeschlossen werden. Das erfindungsgemäße Resistenzgen kann somit nach Kopplung an pflanzliche Promotoren mit geeigneten Vektoren in Pflanzen transformiert und es können so PTC-resistente Pflanzen hergestellt werden.

Die N-Acetylierung von PTC kann auch zur Racemattrennung von synthetischem D,L-PTC genutzt werden, da selektiv nur die L-Form acetyliert wird.

Die Erfindung betrifft somit auch die Verwendung des Resistenzgens zur selektiven N-Acetylierung der L-Form von racemischem PTC.

Die von dem erfindungsgemäßen Resistenzgen kodierte PTCAcetyltransferase kann also dazu benutzt werden, racemisches PTC, wie es beispielsweise nach der deutschen Patentschrift 2 717 440 erhältlich ist, in die optischen Antipoden zu trennen, indem das Racemat der acetylierenden Wirkung dieses Enzyms ausgesetzt wird, wobei selektiv die L-Form angegriffen wird, während die D-Form unverändert bleibt. Das so erhaltene Gemisch kann dann aufgrund seiner unterschiedlichen Eigenschaften in an sich bekannter Weise aufgetrennt werden.

Es ist bekannt, N-Acyl-D,L-Aminosäuren mit gegebenenfalls trägerfixierten Acylasen in Kontakt zu bringen, wobei selektiv die L-Aminosäure freigesetzt wird, die aus dem Gemisch mit der N-Acyl-D-Aminosäure nach Ansäuern mit nicht wassermischbaren Lösemitteln extrahiert werden kann (Britische Patentschrift 1 369 462). Eine entsprechende Auftrennung von N-Acyl-D,L-PTC ist beispielsweise aus der Deutschen Offenlegungsschrift 2 939 269 oder der US-Patentschrift 4 226 941 bekannt.

Das erfindungsgemäß zurückbleibende D-PTC kann in bekannter Weise racemisiert werden (Europäische Patentanmeldung mit der Veröffentlichungsnummer (EP-A) 0 137 371, Beispiel 8), und dann in den Prozeß zurückgeführt werden.

Die Isolierung des Enzyms, worunter hier und im folgenden auch immer der enzymatisch wirksame Teil verstanden werden soll, ist möglich, aber nicht erforderlich. Falls das Enzym isoliert wird, kann es in freier oder trägerfixierter Form eingesetzt werden. Geeignete Träger sind beispielsweise in der EP-A 0 141 223 beschrieben. Zweckmäßig wird jedoch das Enzym nicht isoliert, sondern man setzt beliebige PTC-resistente Zellen ein, die das erfindungsgemäße Enzym exprimieren. So kann zweckmäßig die PTT-resistente Selektante von S. viridochromogenes DSM 4112 eingesetzt werden. Vorteilhaft kann auch eine beliebige, mit dem erfindungsgemäßen Gen transformierte Zelle zum Einsatz gelangen, die in der Lage ist, die PTC-Acetyltransferase zu exprimieren. Das erfindungsgemäße Gen, worunter hier auch aktive Teile desselben verstanden werden, kann hierbei in plasmidintegrierter Form in die Wirtszelle eingebracht werden oder mit anderen üblichen gentechnischen Methoden, beispielsweise durch Transfektion. Zweckmäßig ist beispielsweise der Einbau in ein E. coli-Expressionsplasmid und Transformation von E. coli mit einem solchen Plasmid, beispielsweise nach den aus EP-A 0 163 249 und 0 171 024 bekannten Verfahren.

Zur erfindungsgemäßen N-Acetylierung von L-PTC im Racemat können die Zellen, die die PTC-Acetyltransferase exprimieren, in freier oder fixierter Form eingesetzt werden, wobei die üblichen Fixierungsmethoden Anwendung finden (z.B. Deutsche Offenlegungsschrift 3 237 341 und darin zitierte Literatur).

Die erfindungsgemäße enzymatische Acetylierung von L-PTC erfolgt in der für enzymatische Umsetzungen üblichen Weise, wobei sich die Verfahrensbedingungen an den Gegebenheiten des eingesetzten Organismus orientieren. Grundsätzlich kommen hierfür dieselben Methoden wie für die vorstehend genannten selektiven Entacylierungsverfahren in Betracht.

In den folgenden Beispielen wird die Erfindung näher erläutert. Teile und Prozentangaben beziehen sich auf das Gewicht, sofern keine anderen Angaben gemacht werden.

Beispiel 1: PTT-resistente Selektanten

Der Stamm S. viridochromogenes DSM 4112 wurde auf Minimal-Medium (Hopwood et al., Genetic Manipulation of Streptomyces, A Laboratory Manual, The John Innes Foundation, Norwich, England (1985), S. 233) angezogen und mit PTT in steigenden Konzentrationen versetzt. Bei einer Konzentration von 100 µg/ml wurde pro etwa 10^5 Kolonien eine resistente Kolonie gefunden.

Beispiel 2: Herstellung des Vektors

Das Plasmid pSVH1 (Europäische Patentschrift 0 070 522) wird mit BglII geschnitten, das etwa 7,1 kb große Fragment isoliert und mit dem 1,1 kb BclI-Fragment mit der Thiostrepton-Resistenz (Europäische Patentanmeldung mit der Veröffentlichungsnummer 0 158 201) ligiert. Man erhält das 8,15 kb große Plasmid pEB2 (Figur 2).

Beispiel 3: Isolierung des Resistenzgens

Aus den Selektanten gemäß Beispiel 1 isoliert man die Gesamt-DNA und spaltet sie mit BamHI. Das Plasmid pEB2 wird ebenfalls mit BamHI geöffnet, die beiden Ansätze vereinigt und ligiert. Das Ligationsgemisch wird nach S. lividans TK 23 (erhältlich bei der John Innes Foundation) transformiert, wobei je 1 µg Ligationsgemisch 5000 bis 10000 Transformanten mit einem Insert von etwa 1 - 5 kb erhalten werden. Selektion auf PTT-Resistenz ergibt 2 resistente S. lividans-Kolonien. Aus diesen wird das aufgenommene Plasmid isoliert und mit BamHI geschnitten. Man findet ein 4 kb BamHI-Fragment, welches das für die Resistenz verantwortliche Gen trägt. Dieses Plasmid erhielt die Bezeichnung pPRI (Figur 3).

Durch Retransformation in S. lividans TK 23 kann gezeigt werden, daß die PTT-Resistenz plasmidcodiert ist, da die Transformanten auf Minimalmedium wachsen, das 100 µg/ml PTT enthält.

Beispiel 4: Nachweis der Inaktivierung von PTC durch N-Acetylierung

Zum Nachweis der acetylierenden Aktivität des klonierten Fragments wurden folgende Stämme untersucht: S. viridochromogenes DSM 40736, S. viridochromogenes (PTT-resistente Mutante), S. lividans TK23 und S. lividans TK 23 (pPR1).

Dazu werden die Stämme in Lysemedium A (Europäische Patentanmeldung mit der Veröffentlichungsnummer 0 158 872, S. 6) angeimpft und 2 Tage bei 30 °C im Rundschüttler inkubiert. Nach der Ernte wird 1 mg Mycel in einem geeigneten Puffer (z. B. RS-buffer: C. J. Thompson et al., J. Bacteriol. 151 (1982), 678-685) mit Ultraschall aufgeschlossen. Ein typisches Experiment zur Messung des PTC-Abbaus verläuft folgendermaßen:

250 µl Rohextrakt werden mit 100 µl PTC-Lösung (250 µg/ml) und 50 µl Acetyl-CoA (4 mg/ml) versetzt und 2 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die dann noch vorhandenen PTC-Mengen werden durch HPLC gemessen. Dabei ergibt sich folgendes Ergebnis:

Stamm	nicht umgesetztes PTC / eingesetztes PTC
S. lividans TK23	100%
S. viridochromogenes (DSM 40736)	72%
S. viridochromogenes Selektante	7%
S. lividans TK23 (pPR1)	31%

Daß es sich um eine N-Acetylierung des PTC handelt, kann durch Vergleich mit Referenzsubstanzen in der Dünnschichtchromatographie nachgewiesen werden (keine Anfärbung durch Ninhydrin).

DNA-Sequenz I

```
  IleTrpSerAspValLeuGlyAlaGlyProValLeuProGlyAspAspPhePheSerLeuGlyGlyThrSerIle
   AspLeuGluArgArgProGlyGlyArgSerGlyAlaAlaArgGlyArgLeuLeuLeuProArgArgHisLeuHis
  ArgSerGlyAlaThrSerTrpGlyProValArgCysCysProGlyThrThrSerSerProSerAlaAlaProPro
  AGATCTGGAGCGACGTCCTGGGGGCCGGTCCGGTGCTGCCCGGGGACGACTTCTTCTCCCTCGGCGGCACCTCCA 75
  TCTAGACCTCGCTGCAGGACCCCCGGCCAGGCCACGACGGGCCCCTGCTGAAGAAGAGGGAGCCGCCGTGGAGGT
  SerArgSerArgArgGlyProProArgAspProAlaAlaArgProArgSerArgArgGlyArgArgCysArgTrp
    AspProAlaValAspGlnProGlyThrArgHisGlnGlyProValValGluGluGlyGluAlaAlaGlyGlyAsp
   IleGlnLeuSerThrArgProAlaProGlyThrSerGlyProSerSerLysLysGluArgProProValGluMet

    SerAlaLeuArgValValSerArgIleArgLysGluLeuGlyValProLeuArgLeuAlaValIlePheGluThr
   LeuGlyValAlaGlyGlyLeuAlaHisProGlnGlyThrArgArgAlaThrProAlaArgArgAspLeuArgAsp
  SerArgArgCysGlyTrpSerArgAlaSerAlaArgAsnSerAlaCysHisSerGlySerProOP SerSerArg
  TCTCGGCGTTGCGGGTGGTCTCGCGCATCCGCAAGGAACTCGGCGTGCCACTCCGGCTCGCCGTGATCTTCGAGA 150
  AGAGCCGCAACGCCCACCAGAGCGCGTAGGCGTTCCTTGAGCCGCACGGTGAGGCCGAGCGGCACTAGAAGCTCT
  ArgProThrAlaProProArgAlaCysGlyCysProValArgArgAlaValGlyAlaArgArgSerArgArgSer
    ArgArgGlnProHisAspArgAlaAspAlaLeuPheGluAlaHisTrpGluProGluGlyHisAspGluLeuArg
   GluAlaAsnArgThrThrGluArgMetArgLeuSerSerProThrGlySerArgSerAlaThrIleLysSerVal

    ProSerLeuGluAlaValAlaGluSerValLeuArgGluLeuLysGlyThrAM OC ArgGlyAlaArgHisPro
   AlaValProGlySerGlyGlyArgIleArgThrProArgThrGluGlyAspValValLysArgCysProProPro
  ArgArgProTrpLysArgTrpProAsnProTyrSerAlaAsnOP ArgGlyArgSerLysGluValProAlaThr
  CGCCGTCCCTGGAAGCGGTGGCCGAATCCGTACTCCGCGAACTGAAGGGGACGTAGTAAAGAGGTGCCCGCCACC 225
  GCGGCAGGGACCTTCGCCACCGGCTTAGGCATGAGGCGCTTGACTTCCCCTGCATCATTTCTCCACGGGCGGTGG
  AlaThrGlyProLeuProProArgIleArgValGlyArgValSerProSerThrThrPheLeuHisGlyGlyGly
    ArgGlyGlnPheArgHisGlyPheGlyTyrGluAlaPheGlnLeuProArgLeuLeuSerThrGlyAlaValArg
   GlyAspArgSerAlaThrAlaSerAspThrSerArgSerSerPheProValTyrTyrLeuProAlaArgTrpGly

    LeuSerGlnAsnThrGluGlyArgProHisValSerProGluArgArgProValGluIleArgProAlaThrAla
   AlaPheAlaGluHisArgArgLysThrThrArgGluProArgThrThrProGlyArgAspProSerArgHisArg
  ArgPheArgArgThrProLysGluAspHisThrOP AlaGlnAsnAspAlaArgSerArgSerValProProPro
  CGCTTTCGCAGAACACCGAAGGAAGACCACACGTGAGCCCAGAACGACGCCCGGTCGAGATCCGTCCCGCCACCG 300
  GCGAAAGCGTCTTGTGGCTTCCTTCTGGTGTGCACTCGGGTCTTGCTGCGGGCCAGCTCTAGGCAGGGCGGTGGC
  AlaLysAlaSerCysArgLeuPheValValArgSerGlyLeuValValGlyProArgSerGlyAspArgTrpArg
    LysArgLeuValGlyPheSerSerTrpValHisAlaTrpPheSerAlaArgAspLeuAspThrGlyGlyGlyGly
   SerGluCysPheValSerProLeuGlyCysThrLeuGlySerArgArgGlyThrSerIleArgGlyAlaValAla

    AlaAspMetAlaAlaValCysAspIleValAsnHisTyrIleGluThrSerThrValAsnPheArgThrGluPro
   ArgArgHisGlyGlyGlyLeuArgHisArgGlnSerLeuHisArgAspGluHisGlyGlnLeuProTyrGlyAla
  ProProThrTrpArgArgSerAlaThrSerSerIleThrThrSerArgArgAlaArgSerThrSerValArgSer
  CCGCCGACATGGCGGCGGTCTGCGACATCGTCAATCACTACATCGAGACGAGCACGGTCAACTTCCGTACGGAGC 375
  GGCGGCTGTACCGCCGCCAGACGCTGTAGCAGTTAGTGATGTAGCTCTGCTCGTGCCAGTTGAAGGCATGCCTCG
  ArgArgCysProProProArgArgCysArgOP AspSerCysArgSerSerCysProOP SerGlyTyrProAla
    GlyValHisArgArgAspAlaValAspAspIleValValAspLeuArgAlaArgAspValGluThrArgLeuArg
   AlaSerMetAlaAlaThrGlnSerMetThrLeuOP AM MetSerValLeuValThrLeuLysArgValSerGly

    GlnThrProGlnGluTrpIleAspAspLeuGluArgLeuGlnAspArgTyrProTrpLeuValAlaGluValGlu
   AlaAspSerAlaGlyValAspArgArgProGlyAlaProProGlyProLeuProLeuAlaArgArgArgGlyGly
  ArgArgLeuArgArgSerGlySerThrThrTrpSerAlaSerArgThrAlaThrProGlySerSerProArgTrp
  CGCAGACTCCGCAGGAGTGGATCGACGACCTGGAGCGCCTCCAGGACCGCTACCCCTGGCTCGTCGCCGAGGTGG 450
  GCGTCTGAGGCGTCCTCACCTAGCTGCTGGACCTCGCGGAGGTCCTGGCGATGGGGACCGAGCAGCGGCTCCACC
  AlaSerGluAlaProThrSerArgArgGlyProAlaGlyGlyProGlySerGlyArgAlaArgArgArgProPro
    LeuSerArgLeuLeuProAspValValGlnLeuAlaGluLeuValAlaValGlyProGluAspGlyLeuHisLeu
   CysValGlyCysSerHisIleSerSerArgSerArgArgTrpSerArgAM GlyGlnSerThrAlaSerThrSer
```

DNA-Sequenz I (Fortsetzung)

```
    GlyValValAlaGlyIleAlaTyrAlaGlyProTrpLysAlaArgAsnAlaTyrAspTrpThrValGluSerThr
   GlyArgArgArgArgHisArgLeuArgArgProLeuGluGlyProGlnArgLeuArgLeuAspArgArgValAsp
  ArgAlaSerSerProAlaSerProThrProAlaProGlyArgProAlaThrProThrThrGlyProSerSerArg
  AGGGCGTCGTCGCCGGCATCGCCTACGCCGGCCCCTGGAAGGCCCGCAACGCCTACGACTGGACCGTCGAGTCGA 525
  TCCCGCAGCAGCGGCCGTAGCGGATGCGGCCGGGGACCTTCCGGGCGTTGCGGATGCTGACCTGGCAGCTCAGCT
  ProArgArgArgArgCysArgArgArgArgGlyArgSerProGlyCysArgArgArgSerSerArgArgThrSer
    AlaAspAspGlyAlaAspGlyValGlyAlaGlyProLeuGlyAlaValGlyValValProGlyAspLeuArgArg
   ProThrThrAlaProMetAlaAM AlaProGlyGlnPheAlaArgLeuAlaAM SerGlnValThrSerAspVal

    ValTyrValSerHisArgHisGlnArgLeuGlyLeuGlySerThrLeuTyrThrHisLeuLeuLysSerMetGlu
   GlyValArgLeuProProAlaProAlaAlaArgThrGlyLeuHisProLeuHisProProAlaGluValHisGly
  ArgCysThrSerProThrGlyThrSerGlySerAspTrpAlaProProSerThrProThrCysOP SerProTrp
  CGGTGTACGTCTCCCACCGGCACCAGCGGCTCGGACTGGGCTCCACCCTCTACACCCACCTGCTGAAGTCCATGG 600
  GCCACATGCAGAGGGTGGCCGTGGTCGCCGAGCCTGACCCGAGGTGGGAGATGTGGGTGGACGACTTCAGGTACC
  ProThrArgArgGlyGlyAlaGlyAlaAlaArgValProSerTrpGlyArgCysGlyGlyAlaSerThrTrpPro
    HisValAspGlyValProValLeuProGluSerGlnAlaGlyGlyGluValGlyValGlnGlnLeuGlyHisLeu
   ThrTyrThrGluTrpArgCysTrpArgSerProSerProGluValArgAM ValTrpArgSerPheAspMetSer

    AlaGlnGlyPheLysSerValValAlaValIleGlyLeuProAsnAspProSerValArgLeuHisGluAlaLeu
   GlyProGlyLeuGlnGluArgGlyArgArgHisArgThrAlaGlnArgProGluArgAlaProAlaArgGlyAla
  ArgProArgAlaSerArgAlaTrpSerProSerSerAspCysProThrThrArgAlaCysAlaCysThrArgArg
  AGGCCCAGGGCTTCAAGAGCGTGGTCGCCGTCATCGGACTGCCCAACGACCCGAGCGTGCGCCTGCACGAGGCGC 675
  TCCGGGTCCCGAAGTTCTCGCACCAGCGGCAGTAGCCTGACGGGTTGCTGGGCTCGCACGCGGACGTGCTCCGCG
  ProGlyProSerOP SerArgProArgArgOP ArgValAlaTrpArgGlySerArgAlaGlyAlaArgProAla
    GlyLeuAlaGluLeuAlaHisAspGlyAspAspSerGlnGlyValValArgAlaHisAlaGlnValLeuArgGlu
   AlaTrpProLysLeuLeuThrThrAlaThrMetProSerGlyLeuSerGlyLeuThrArgArgCysSerAlaSer

    GlyTyrThrAlaArgGlyThrLeuArgAlaAlaGlyTyrLysHisGlyGlyTrpHisAspValGlyPheTrpGln
   ArgIleHisArgAlaArgAspAlaAlaGlySerArgLeuGlnAlaArgGlyLeuAlaArgArgGlyValLeuAla
  SerAspThrProArgAlaGlyArgCysGlyGlnProAlaThrSerThrGlyAlaGlyThrThrTrpGlySerGly
  TCGGATACACCGCGCGCGGGACGCTGCGGGCAGCCGGCTACAAGCACGGGGGCTGGCACGACGTGGGGTTCTGGC 750
  AGCCTATGTGGCGCGCGCCCTGCGACGCCCGTCGGCCGATGTTCGTGCCCCCGACCGTGCTGCACCCCAAGACCG
  ArgIleCysArgAlaArgSerAlaAlaProLeuArgSerCysAlaArgProSerAlaArgArgProThrArgAla
    SerValGlyArgAlaProArgGlnProCysGlyAlaValLeuValProAlaProValValHisProGluProLeu
   ProTyrValAlaArgProValSerArgAlaAlaProAM LeuCysProProGlnCysSerThrProAsnGlnCys

    ArgAspPheGluLeuProAlaProProArgProValArgProValThrGlnIle
   AlaArgLeuArgAlaAlaGlyProAlaProProArgProAlaArgHisThrAsp
  SerAlaThrSerSerCysArgProArgProAlaProSerGlyProSerHisArgSer
  AGCGCGACTTCGAGCTGCCGGCCCCGCCCCGCCCCGTCCGGCCCGTCACACAGATCT 807
  TCGCGCTGAAGCTCGACGGCCGGGGCGGGGCGGGGCAGGCCGGGCAGTGTGTCTAGA
  AlaArgSerArgAlaAlaProGlyAlaGlyGlyArgGlyAlaArgOP ValSerArg
    AlaValGluLeuGlnArgGlyArgGlyAlaGlyAspProGlyAspCysLeuAsp
   ArgSerLysSerSerGlyAlaGlyGlyArgGlyThrArgGlyThrValCysIle
```

DNA-Sequenz II

```
AGATCTGGAGCGACGTCCTGGGGGCCGGTCCGGTGCTGCCCGGGGACGACTTCTTCTCCC
TCTAGACCTCGCTGCAGGACCCCCGGCCAGGCCACGACGGGCCCCTGCTGAAGAAGAGGG
```

1 BGLII XHDII, 2 DPNI SAU3A, 5 GSUI, 12 AATII ACYI, 13 MAEII , 17 APYI ECORII, 26 RSRII, 27 AVAII, 35 BBVI, 39 AVAI NCII SMAI, 40 NCII, 52 MBDII, 59 MNLI,

```
TCGGCGGCACCTCCATCTCGGCGTTGCGGGTGGTCTCGCGCATCCGCAAGGAACTCGGCG
AGCCGCCGTGGAGGTAGAGCCGCAACGCCCACCAGAGCGCGTAGGCGTTCCTTGAGCCGC
```

66 HGICI, 70 MNLI, 97 FNUDII, 100 SFANI, 101 FOKI,

```
TGCCACTCCGGCTCGCCGTGATCTTCGAGACGCCGTCCCTGGAAGCGGTGGCCGAATCCG
ACGGTGAGGCCGAGCGGCACTAGAAGCTCTGCGGCAGGGACCTTCGCCACCGGCTTAGGC
```

122 BGLI, 140 DPNI SAU3A, 142 MBDII, 149 ACYI HGAI TTH111I, 158 APYI ECORII, 169 CFRI GDIII, 174 HINFI, 180 RSAI,

```
TACTCCGCGAACTGAAGGGGACGTAGTAAAGAGGTGCCCGCCACCCGCTTTCGCAGAACA
ATGAGGCGCTTGACTTCCCCTGCATCATTTCTCCACGGGCGGTGGGCGAAAGCGTCTTGT
```

185 FNUDII, 201 MAEII, 211 MNLI, 213 HGICI, 214 SDUI,

```
CCGAAGGAAGACCACACGTGAGCCCAGAACGACGCCCGGTCGAGATCCGTCCCGCCACCG
GGCTTCCTTCTGGTGTGCACTCGGGTCTTGCTGCGGGCCAGCTCTAGGCAGGGCGGTGGC
```

247 MBDII, 254 AFLIII, 255 PMACI, 256 MAEII, 260 HGIJII SDUI , 271 ACYI HGAI, 275 NCII, 283 XHOII, 284 BINI DPNI SAU3A,

```
CCGCCGACATGGCGGCGGTCTGCGACATCGTCAATCACTACATCGAGACGAGCACGGTCA
GGCGGCTGTACCGCCGCCAGACGCTGTAGCAGTTAGTGATGTAGCTCTGCTCGTGCCAGT
```

303 BGLI, 308 NLAIII, 324 TTH111I, 350 HGIAI SDUI, 357 HINCI I,

```
ACTTCCGTACGGAGCCGCAGACTCCGCAGGAGTGGATCGACGACCTGGAGCGCCTCCAGG
TGAAGGCATGCCTCGGCGTCTGAGGCGTCCTCACCTAGCTGCTGGACCTCGCGGAGGTCC
```

367 RSAI, 380 HINFI, 394 BINI, 395 DPNI SAU3A, 404 APYI ECOR II, 405 GSUI, 409 HAEII, 413 MNLI, 414 GSUI, 416 APYI ECORII , 419 AVAII,

```
ACCGCTACCCCTGGCTCGTCGCCGAGGTGGAGGGCGTCGTCGCCGGCATCGCCTACGCCG
TGGCGATGGGGACCGAGCAGCGGCTCCACCTCCCGCAGCAGCGGCCGTAGCGGATGCGGC
```

430 APYI ECORII, 444 MNLI, 450 MNLI, 453 ACYI, 454 HGAI, 462 NAEI, 466 SFANI, 477 NAEI,

```
GCCCCTGGAAGGCCCGCAACGCCTACGACTGGACCGTCGAGTCGACGGTGTACGTCTCCC
CGGGGACCTTCCGGGCGTTGCGGATGCTGACCTGGCAGCTCAGCTGCCACATGCAGAGGG
```

484 APYI ECORII, 511 AVAII, 519 HINFI, 521 ACCI HINCII SALI, 530 RSAI, 532 MAEII,

DNA-Sequenz II (Fortsetzung)

```
541  ACCGGCACCAGCGGCTCGGACTGGGCTCCACCCTCTACACCCACCTGCTGAAGTCC
     TGGCCGTGGTCGCCGAGCCTGACCCGAGGTGGGAGATGTGGGTGGACGACTTCAGGT
        ^   ^           ^       ^   ^   ^          ^^

     544 HGICI, 549 NSPBII, 563 HGIJII SDUI, 572 MNLI, 578 TAQII,
      583 BSPMI, 595 NCOI STYI, 596 NLAIII, 600 MNLI,

601  AGGCCCAGGGCTTCAAGAGCGTGGTCGCCGTCATCGGACTGCCCAACGACCCGAGCGTGC
     TCCGGGTCCCGAAGTTCTCGCACCAGCGGCAGTAGCCTGACGGGTTGCTGGGCTCGCACG
        ^                                                ^

     605 APYI ECORII, 650 AVAI,

661  GCCTGCACGAGGCGCTCGGATACACCGCGCGCGGGACGCTGCGGGCAGCCGGCTACAAGC
     CGGACGTGCTCCGCGAGCCTATGTGGCGCGCGCCCTGCGACGCCCGTCGGCCGATGTTCG
           ^ ^               ^^^ ^   ^  ^     ^  ^      ^

     669 MNLI, 671 HAEII, 686 FNUDII, 687 BSSHII, 688 FNUDII, 690
      FNUDII, 695 HGAI, 698 BBVI, 705 BBVI, 708 NAEI, 716 TTH111
     I,

721  ACGGGGGCTGGCACGACGTGGGGTTCTGGCAGCGCGACTTCGAGCTGCCGGCCCCGCCCC
     TGCCCCCGACCGTGCTGCACCCCAAGACCGTCGCGCTGAAGCTCGACGGCCGGGGCGGGG
              ^   ^           ^   ^         ^^  ^

     732 DRAIII, 736 MAEII, 749 BBVI, 753 FNUDII, 763 ALUI, 764 B
     BVI, 767 NAEI,

781  GCCCCGTCCGGCCCGTCACACAGATCT
     CGGGGCAGGCCGGGCAGTGTGTCTAGA
              ^      ^^

     795 MAEIII, 802 BGLII XHOII, 803 DPNI SAU3A,
```

Patentansprüche

Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten : BE, CH, DE, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL, SE

1. Resistenzgen gegen Phosphinothricin (PTC), erhältlich aus der Gesamt-DNA von auf Phosphinothricyl-alanyl-alanin (PTT)-Resistenz selektiertem Streptomyces viridochromogenes DSM 4112 durch Schneiden mit BamHI, Klonieren eines 4,0 kb großen Fragments und Selektion auf PTT-Resistenz.

2. Gen nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch die Restriktionskarte gemäß Figur 1.

3. Gen nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet durch die DNA-Sequenz I (Anhang), Position 258-806.

4. Verwendung des Gens nach Anspruch 1 bis 3 zur Herstellung PTC-resistenter Pflanzen.

5. Verwendung des Gens nach Anspruch 1 bis 3 als PTT-Resistenz-Marker in Bakterien.

6. Verwendung des Gens nach Anspruch 1 bis 3 als PTC-Resistenzmarker in Pflanzenzellen.

7. Verwendung des Gens nach Anspruch 1 bis 3 zur selektiven N-Acetylierung der L-Form von racemischem PTC.

8. PTC-resistente Pflanzen, gekennzeichnet durch ein Gen nach einem der Ansprüche 1 bis 3.

DNA-Sequenz II (Fortsetzung)

```
541  ACCGGCACCAGCGGCTCGGACTGGGCTCCACCCTCTACACCCACCTGCTGAAGTCC
     TGGCCGTGGTCGCCGAGCCTGACCCGAGGTGGGAGATGTGGGTGGACGACTTCAGGT
        ^    ^          ^         ^     ^     ^           ^^

     544 HGICI, 549 NSPBII, 563 HGIJII SDUI, 572 MNLI, 578 TAQII,
     583 BSPMI, 595 NCOI STYI, 596 NLAIII, 600 MNLI,

601  AGGCCCAGGGCTTCAAGAGCGTGGTCGCCGTCATCGGACTGCCCAACGACCCGAGCGTGC
     TCCGGGTCCCGAAGTTCTCGCACCAGCGGCAGTAGCCTGACGGGTTGCTGGGCTCGCACG
           ^                                                ^

     605 APYI ECORII, 650 AVAI,

661  GCCTGCACGAGGCGCTCGGATACACCGCGCGCGGGACGCTGCGGGCAGCCGGCTACAAGC
     CGGACGTGCTCCGCGAGCCTATGTGGCGCGCGCCCTGCGACGCCCGTCGGCCGATGTTCG
              ^ ^              ^^^ ^     ^  ^     ^  ^       ^

     669 MNLI, 671 HAEII, 686 FNUDII, 687 BSSHII, 688 FNUDII, 690
     FNUDII, 695 HGAI, 698 BBVI, 705 BBVI, 708 NAEI, 716 TTHIIII
     I,

721  ACGGGGGCTGGCACGACGTGGGGTTCTGGCAGCGCGACTTCGAGCTGCCGGCCCCGCCCC
     TGCCCCCGACCGTGCTGCACCCCAAGACCGTCGCGCTGAAGCTCGACGGCCGGGGCGGGG
              ^   ^            ^   ^         ^^  ^

     732 DRAIII, 736 MAEII, 749 BBVI, 753 FNUDII, 763 ALUI, 764 B
     BVI, 767 NAEI,

781  GCCCCGTCCGGCCCGTCACACAGATCT
     CGGGGCAGGCCGGGCAGTGTGTCTAGA
                  ^     ^^

     795 MAEIII, 802 BGLII XHOII, 803 DPNI SAU3A,
```

Patentansprüche

Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten : BE, CH, DE, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL, SE

1. Resistenzgen gegen Phosphinothricin (PTC), erhältlich aus der Gesamt-DNA von auf Phosphinothricyl-alanyl-alanin (PTT)-Resistenz selektiertem Streptomyces viridochromogenes DSM 4112 durch Schneiden mit BamHI, Klonieren eines 4,0 kb großen Fragments und Selektion auf PTT-Resistenz.

2. Gen nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch die Restriktionskarte gemäß Figur 1.

3. Gen nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet durch die DNA-Sequenz I (Anhang), Position 258-806.

4. Verwendung des Gens nach Anspruch 1 bis 3 zur Herstellung PTC-resistenter Pflanzen.

5. Verwendung des Gens nach Anspruch 1 bis 3 als PTT-Resistenz-Marker in Bakterien.

6. Verwendung des Gens nach Anspruch 1 bis 3 als PTC-Resistenzmarker in Pflanzenzellen.

7. Verwendung des Gens nach Anspruch 1 bis 3 zur selektiven N-Acetylierung der L-Form von racemischem PTC.

8. PTC-resistente Pflanzen, gekennzeichnet durch ein Gen nach einem der Ansprüche 1 bis 3.

Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten : AT, ES

1. Verfahren zur Gewinnung eines Resistenzgens gegen Phosphinothricin (PTC), dadurch gekennzeichnet, daß man aus der Gesamt-DNA von auf Phosphinothricyl-alanyl-alanin (PTT)-Resistenz selektiertem Streptomyces viridochromogenes DSM 4112 durch Schneiden mit BamHI ein 4,0 kb großes Fragment isoliert, dieses ganz oder ein das Resistenzgen enthaltendes Teilfragment davon kloniert und auf PTT-Resistenz selektiert.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man das innerhalb des 4,0 kb großen BamHI-Fragments gelegene, 0,8 kb große BglII-Fragment kloniert.

3. Verwendung des nach Anspruch 1 oder 2 erhältlichen Gens zur Herstellung PTC-resistenter Pflanzen.

4. Verwendung des nach Anspruch 1 oder 2 erhältlichen Gens als PTT-Resistenzmarker in Bakterien.

5. Verwendung des nach Anspruch 1 oder 2 erhältlichen Gens als PTC-Resistenzmarker in Pflanzenzellen.

6. Verwendung des nach Anspruch 1 oder 2 erhältlichen Gens zur selektiven N-Acetylierung der L-Form von racemischem PTC.

Claims

Claims for the following Contracting States : BE, CH, DE, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL, SE

1. A phosphinothricin (PTC) resistance gene which can be obtained by cutting, with BamHI, the total DNA from Streptomyces viridochromogenes DSM 4112 which has been selected for phosphinothricyl-alanyl-alanine (PTT) resistance, by cloning a fragment 4.0 kb in size, and by selection for PTT resistance.

2. The gene as claimed in claim 1, which has the restriction map shown in Figure 1.

3. The gene as claimed in claim 1 and 2, which has the DNA sequence I (annex), position 258-806.

4. The use of the gene as claimed in claims 1 to 3 for the production of PTC-resistant plants.

5. The use of the gene as claimed in claims 1 to 3 as PTT resistance marker in bacteria.

6. The use of the gene as claimed in claims 1 to 3 as PTC resistance marker in plant cells.

7. The use of the gene as claimed in claims 1 to 3 for the selective N-acetylation of the L-form of racemic PTC.

8. PTC-resistant plants which have a gene as claimed in any of claims 1 to 3.

Claims for the following Contracting States : AT, ES

1. A process for obtaining a phosphinothricin (PTC) resistance gene which comprises isolation of a fragment 4.0 kb in size by cutting, with BamHI, from the total DNA from Streptomyces viridochromogenes DSM 4112 which has been selected for phosphinothricyl-alanyl-alanine (PTT) resistance, cloning the whole of this fragment or a part thereof containing the resistance gene, and selecting for PTT resistance.

2. The process as claimed in claim 1, wherein the BglII fragment 0.8 kb in size cut within the BamHI fragment 4.0 kb in size is cloned.

3. The use of the gene obtainable as claimed in claim 1 or 2 for the production of PTC-resistant plants.

4. The use of the gene obtainable as claimed in claim 1 or 2 as PTT resistance marker in bacteria.

5. The use of the gene obtainable as claimed in claim 1 or 2 as PTC resistance marker in plant cells.

6. The use of the gene obtainable as claimed in claim 1 or 2 for selective N-acetylation of the L-form of racemic PTC.

Revendications

Revendications pour les Etats contractants suivants : BE, CH, DE, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL, SE

1. Gène de résistance à la phosphinothricine (PTC), obtenu, à partir de l'ADN total de Streptomyces viridochromogenes DSM 4112 sélectionné pour sa résistance à la phosphinothricyl-alanyl-alanine (PTT), par coupure avec BamHI, clonage d'un fragment de taille 4,0 kb et sélection pour la résistance au PTT.

2. Gène selon la revendication 1, caractérisé par la carte de restriction de la Figure 1.

3. Gène selon la revendication 1 ou 2, caractérisé par la séquence d'ADN I (annexe), position 258-806.

4. Utilisation du gène selon une des revendications 1 à 3, pour produire des plantes résistantes à la PTC.

5. Utilisation du gène selon une des revendications 1 à 3, comme marqueur de la résistance au PTT chez les bactéries.

6. Utilisation du gène selon une des revendications 1 à 3, comme marqueur de la résistance au PTT dans les cellules végétales.

7. Utilisation du gène selon une des revendications 1 à 3, pour la N-acétylation sélective de la forme L de la PTC racémique.

8. Plantes résistantes à la PTC, caractérisées par un gène selon une des revendications 1 à 3.

Revendications pour les Etats contractants suivants : AT, ES

1. Procédé d'obtention d'un gène de résistance à la phosphinothricine (PTC), caractérisé en ce que, en partant de l'ADN total de Streptomyces viridochromogenes DSM 4112 sélectionné pour sa résistance à la phosphinothricyl-alanyl-alanine (PTT), on isole, par coupure avec BamHI, un fragment de taille 4,0 kb, on clone l'intégralité de ce dernier ou seulement un de ses segments contenant le gène de résistance, et on le sélectionne pour sa résistance au PTT.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on clone le fragment BglII de taille 0,8 kb, présent à l'intérieur du fragment BamHI de taille 4,0 kb.

3. Utilisation du gène obtenu selon une des revendications 1 ou 2, pour produire des plantes résistantes à la PTC.

4. Utilisation du gène obtenu selon une des revendications 1 ou 2, comme marqueur de la résistance au PTT chez les bactéries.

5. Utilisation du gène obtenu selon une des revendications 1 ou 2, comme marqueur de la résistance au PTC dans les cellules végétales.

6. Utilisation du gène obtenu selon une des revendications 1 ou 2, pour la N-acétylation sélective de la forme L de la PTC racémique.