



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 34 308 T2** 2006.02.09

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 633 317 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 34 308.0**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 420 177.1**

(96) Europäischer Anmeldetag: **23.06.1994**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **11.01.1995**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **23.03.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **09.02.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/82** (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

9308029 25.06.1993 FR

(73) Patentinhaber:

Bayer CropScience S.A., Lyon, FR

(74) Vertreter:

BEETZ & PARTNER Patentanwälte, 80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, NL, PT, SE

(72) Erfinder:

Atanassova, Rossitza, F-67000 Strasbourg, FR; De Rose, Richard, F-69009 Lyon, FR; Freyssinet, Georges, F-69450 St. Cyr au Mont d'Or, FR; Gigot, Claude, F-67000 Strasbourg, FR; Lebrun, Michel, F-69009 Lyon, FR

(54) Bezeichnung: **Isolierte DNA-Sequenz, die als Terminatorregion in chimären Genen zur Transformation von Pflanzen eingesetzt werden kann**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Terminatorregionen, die von transkribierten Pflanzengen isoliert wurden, neue chimäre Gene, die sie enthalten, und ihre Verwendung für die Transformation von Pflanzen.

[0002] Zahlreiche phänotypische Merkmale, die mit der Expression von einem oder mehreren Genelementen in Verbindung stehen, können in das Genom von Pflanzen integriert werden und so diesen transgenen Pflanzen vorteilhafte agronomische Eigenschaften verleihen. Folgende können kurz genannt werden: Resistenzen gegen Pflanzenpathogene, Resistenz gegen phytotoxische Pflanzenschutzmittel, Produkt von Substanzen, die für die Ernährung von Interesse sind oder von pharmakologisch interessanten Substanzen. Außer der Isolierung und Charakterisierung von Genelementen, die für diese verschiedenen Merkmale codieren, muß eine entsprechende Expression gewährleistet sein. Diese entsprechende Expression kann qualitativ oder quantitativ sein. Bei der qualitativen Expression kann sie zum Beispiel räumlich sein: eine bevorzugte Expression in einem bestimmten Gewebe; oder sie kann zeitabhängig sein: induzierbare Expression. Quantitative Expression: angehäuften Menge des Expressionsprodukts des eingebrachten Gens. Diese entsprechende Expression hängt größtenteils vom Vorhandensein von regulatorischen Genelementen ab, die mit den Transgenen in Verbindung stehen, insbesondere was die quantitativen und qualitativen Elemente betrifft. Bei den wesentlichen Elementen, die diese entsprechende Regulation gewährleisten, ist die Verwendung von homologen oder heterologen, einfachen oder zusammengesetzten Promoterregionen vielfach in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben worden. Die Verwendung einer Terminatorregion stromaufwärts von dem Transgen wurden einzig und allein für den Zweck verwendet, einen Abschluß einzufügen, mit dem der Vorgang der Transkription des Transgens gestoppt werden kann, ohne daß etwas über ihre Rolle bei der Qualität der Expression des Transgens oder der Expressionshöhe des Transgens vorausgesetzt wird.

[0003] Die vorliegende Erfindung betrifft chimäre Gene, die Terminatorregionen von Genen, die in Pflanzen transkribiert werden, enthalten, insbesondere Terminatorregionen von pflanzlichen Histon-Genen, sowie ihre Verwendung für die Transformation von Pflanzen. Genauer gesagt betrifft sie die gemeinsame Verwendung von Terminatorregionen und Promoterregionen, die auf ein- und demselben transkribierten Gen von Pflanzen isoliert wurden. Sie ermöglicht gleichzeitig die quantitative und qualitative entsprechende Expression der Transgene unter der Kontrolle dieser Elemente dieser Genregulation. Diese entsprechende Expression, die durch die Anwendung der vorliegenden Erfindung erzielt wird, kann Merkmale wie folgende betreffen: Resistenz gegen Pflanzenpathogene, Resistenz gegen phytotoxische Pflanzenschutzmittel, Produkt von Substanzen, die für die Ernährung von Interesse sind oder von pharmakologisch interessanten Substanzen. Insbesondere ermöglicht sie durch eine vorzugsweise qualitative und quantitative Expression des Expressionsprodukts von chimären Genen in stark wachsenden Pflanzenregionen den transgenen Pflanzen eine erhöhte Herbizidtoleranz zu vermitteln. Diese bestimmte entsprechende Expression des Herbizidresistenzgens wird dadurch erzielt, das man gemeinsam Promoterregulationselemente und Terminatorregionselemente des Histon-Gens H4A748 *Arabidopsis thaliana* verwendet. Solch ein Expressionsprofil kann für alle Merkmale, die von Interesse sind, wie den oben beschriebenen Merkmalen, mit den für die Verleihung einer erhöhten Herbizidtoleranz verwendeten Regulationselementen erhalten werden. Die vorliegende Erfindung betrifft auch die mit diesen Genen transformierten Pflanzenzellen und die von diesen Zellen regenerierten transformierten Pflanzen sowie die Pflanzen, die aus Kreuzungen mit diesen transformierten Pflanzen stammen.

[0004] Unter den für den Schutz von Kulturen verwendeten Pflanzenschutzprodukten sind die systemischen Produkte dadurch gekennzeichnet, das sie nach der Ausbringung in der Pflanze transportiert werden und das sie in gewissen Fällen sich in den Teilen mit raschem Wachstum, insbesondere den Sproß- und Wurzelapices anhäufen, was bei Herbiziden die Veränderung bis hin zur Zerstörung von empfindlichen Pflanzen verursacht. Bei gewissen dieser Herbizide, die sich derart verhalten, ist der primäre Wirkungsmechanismus bekannt und beruht auf einer Inaktivierung von charakterisierten Enzymen, die an den Biosynthesewegen von Verbindungen, die für die gute Entwicklung der Zielpflanzen erforderlich sind, beteiligt sind. Die als Angriffspunkt dienenden Enzyme dieser Produkte können in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten lokalisiert sein, und durch Beobachtung der Wirkungsweise von bekannten Produkten erkennt man am häufigsten, daß diese im Kompartiment der Plastiden lokalisiert sind.

[0005] Die Toleranz von Pflanzen, die für ein Produkt, das zu dieser Herbizidgruppe zählt, empfindlich sind und deren primäres Ziel bekannt ist, läßt sich durch ein stabiles Einbringen eines Gens, das für das als Angriffspunkt dienende Enzym codiert und das beliebigen phylogenetischen Ursprungs ist und in Bezug auf die Hemmeigenschaften des Expressionsprodukts dieses Gens durch das Herbizid mutiert oder nicht mutiert ist, in ihr Genom erzielen. Ein anderer Ansatz besteht darin, das man ein Gen beliebigen phylogenetischen Ur-

sprungs, das für ein Enzym codiert, das eine Verstoffwechslung des Herbizids zu einer nicht aktiven Verbindung, die für die Entwicklung der Pflanze nicht toxisch ist, zu verursachen vermag, stabil in das Genom von empfindlichen Pflanzen einbringt. Im letztgenannten Fall ist es nicht erforderlich, daß der Angriffspunkt des Herbizids charakterisiert worden ist.

[0006] Bei einem gegebenen Translokations- und Anhäufungsmodus von Produkten dieser Art in den behandelnden Pflanzen ist es von Interesse, das Translationsprodukt dieser Gene exprimieren zu können, um ihre bevorzugte Expression und ihre Anhäufung in den Regionen der Pflanze mit raschem Wachstum, wo sich diese Produkte anhäufen, zu gestatten. Weiterhin ist es in dem Fall, wo der Angriffspunkt dieser Produkte in einem Zellkompartiment, bei dem es sich nicht um das Zytoplasma handelt, lokalisiert ist, von Interesse, das Translationsprodukt dieser Gene in Form eines Vorläufers, der eine Polypeptidsequenz enthält, die die Zielsteuerung des Proteins, das die Toleranz vermittelt, in das entsprechende Kompartiment gestattet, insbesondere in das Kompartiment der Plastiden, exprimieren zu können.

[0007] Als Beispiel, das diesen Ansatz veranschaulicht, sind Glyphosate, Sulfosate oder Fosametine zu nennen, bei denen es sich um systemische Breitbandherbizide aus der Familie der Phosphonomethylglycine handelt. Sie wirken im wesentlichen als kompetitive Hemmer von PEP (Phosphoenolpyruvat) der 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase (EPSPS, EC 2.5.1.19). Nach ihrer Ausbringung auf die Pflanze werden sie in die Pflanze transportiert, wo sie sich in Teilen mit raschem Wachstum, insbesondere den Sproß- und Wurzelapices, anhäufen und zu einer Veränderung bis hin zur Zerstörung von empfindlichen Pflanzen führen.

[0008] Die EPSPS, der Hauptangriffspunkt dieser Produkte, ist ein Enzym des aromatischen Aminosäure-Biosynthesewegs, der in dem Kompartiment der Plastiden lokalisiert ist. Dieses Enzym wird von einem oder mehreren im Kern befindlichen Genen codiert und in Form eines zytoplasmischen Vorläufers synthetisiert, der anschließend in die Plastiden importiert wird, wo er sich in seiner reifen Form anhäuft.

[0009] Eine Toleranz von Pflanzen gegenüber Glyphosate und Produkten dieser Familie wird dadurch erzielt, das man ein EPSPS-Gen pflanzlichen oder bakteriellen Ursprungs, das in bezug auf die Merkmale der Hemmung des Produkts dieses Gens durch Glyphosate mutiert oder nicht mutiert ist, stabil in das Genom dieser Pflanzen einbringt. Bei dem gegebenen Wirkungsmodus von Glyphosate ist es von Interesse, das Produkt der Translation dieses Gens exprimieren zu können, um seine starke Anhäufung in den Plastiden und auch in den Regionen der Pflanze mit raschem Wachstum, wo sich die Produkte anhäufen, zu gestatten.

[0010] So ist zum Beispiel aus dem Amerikanischen Patent 4,535,060 bekannt, einer Pflanze eine Toleranz gegen ein Herbizid des oben genannten Typs, insbesondere N-Phosphonomethylglycin oder Glyphosate, dadurch zu verleihen, das man ein Gen, das für eine EPSPS codiert, die mindestens eine Mutation trägt, die dieses Enzym nach Lokalisierung des Enzyms in dem Kompartiment der Plastiden stärker resistent gegen seinen kompetitiven Hemmer (Glyphosate) macht, in das Genom von Pflanzen einbringt. Diese Techniken müssen jedoch noch verbessert werden, um eine bessere Verlässlichkeit bei der Verwendung von diesen Pflanzen bei Behandlung mit diesen Produkten unter agronomischen Bedingungen zu gewährleisten.

[0011] In der vorliegenden Erfindung versteht man unter „Pflanze“ jeglichen differenzierten mehrzelligen Organismus, der zur Photosynthese befähigt ist, und unter „pflanzlicher Zelle“ jegliche Zelle, die von einer Pflanze stammt und die undifferenzierte Gewebe wie Kalli oder differenzierte Gewebe wie Embryonen oder Pflanzenteile oder Pflanzen oder Samen darstellen kann.

[0012] Unter „Terminatorregion“ versteht man eine isolierte DNA-Sequenz mit unterschiedlicher Länge, die sich stromaufwärts von einer Codierregion befindet und die das Ende der Transkription signalisiert. Unter Gen für Toleranz gegen ein Herbizid versteht man jegliches Gen eines beliebigen phylogenetischen Ursprungs, das entweder für das für das Herbizid als Angriffspunkt dienende Enzym, das eine oder mehrere Mutationen in bezug auf die Eigenschaften der Hemmung durch das Herbizid aufweist oder nicht mutiert ist, oder für ein Enzym, das zur Verstoffwechslung des Herbizids zu einer nicht aktiven Verbindung, die für die Pflanze nicht toxisch ist, fähig ist, codiert. Unter Regionen der Pflanze mit raschem Wachstum versteht man diejenigen Regionen, wo eine starke Zellteilungsaktivität vorliegt, insbesondere die Regionen der Sproßspitze.

[0013] Die vorliegende Erfindung betrifft die Herstellung von transformierten Pflanzen, die insbesondere eine erhöhte Toleranz gegen Herbizide, die sich in den Regionen mit raschem Wachstum bei den behandelten Pflanzen anhäufen, aufweisen, und zwar dadurch, das man die mit Hilfe von neuen chimären Genen, die ein Gen für Toleranz gegen diese Produkte umfassen, transformierte Zellen regeneriert. Die Erfindung betrifft weiterhin die Herstellung von transformierten Pflanzen mit einer erhöhten Toleranz gegen Herbizide der Familie

der Phosphonomethylglycine, und zwar dadurch, das man die mit Hilfe von neuen chimären Genen, die ein Gen für Toleranz gegen diese Herbizide umfassen, transformierten Zellen regeneriert. Die Erfindung betrifft außerdem diese neuen chimären Gene, sowie transformierte Pflanzen, die in bezug auf eine bessere Toleranz in den Teilen mit starkem Wachstum bei diesen Pflanzen toleranter sind, sowie die Pflanzen, die aus Kreuzungen mit diesen transformierten Pflanzen hervorgehen. Genauer gesagt betrifft die Erfindung ein chimäres Gen, das in Transkriptionsrichtung eine Promoterregion, eine Sequenz, die für ein interessierendes agronomisches Protein codiert, und eine Terminatorregion umfaßt, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Terminatorregion um eine Terminatorregion eines pflanzlichen Histon-Gens handelt.

[0014] Gemäß einer bestimmten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein chimäres Gen dafür, daß Pflanzen insbesondere eine erhöhte Toleranz gegen ein Herbizid, dessen Angriffspunkt die EPSPS ist, verliehen wird wobei das Gen in Transkriptionsrichtung eine Promoterregion, eine Transitpeptidregion, eine Sequenz, die für ein Enzym für Toleranz gegenüber Produkten der Familie der Phosphonomethylglycine codiert, sowie eine Terminatorregion enthält, dadurch gekennzeichnet, daß die Terminatorregion aus einem Fragment einer Terminatorregion eines pflanzlichen Histon-Gens in beliebiger Orientierung in bezug auf ihre ursprüngliche Orientierung in dem Gen, von dem sie abstammt, besteht, wodurch die bevorzugte Expression und Anhäufung des Herbizidtoleranzproteins in den Zonen, in denen das Herbizid angehäuft wird, gestattet wird.

[0015] Das Histon-Gen, von dem die erfindungsgemäße Terminatorregion stammt, stammt von einer monokotylen Pflanze wie zum Beispiel Weizen, Mais oder Reis oder vorzugsweise von einer dikotylen Pflanze wie zum Beispiel Luzerne, Sonnenblume, Sojabohne, Raps oder vorzugsweise *Arabidopsis thaliana*. Vorzugsweise verwendet man ein Histon-Gen des H3-Typs oder vorzugsweise des H4-Typs.

[0016] Die Transitpeptidregion umfaßt in Transkriptionsrichtung mindestens ein Transitpeptid eines pflanzlichen Gens, das für ein plastidär lokalisiertes Enzym codiert, einen Teil der Sequenz des reifen N-terminalen Abschnitts eines pflanzlichen Gens, das für ein plastidär lokalisiertes Enzym codiert, sowie ein zweites Transitpeptid eines pflanzlichen Gens, das für ein plastidär lokalisiertes Enzym codiert, vorzugsweise das Gen der kleinen Untereinheit der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RuBisCO) gemäß der Europäischen Patentanmeldung 508 909. Aufgabe dieser charakteristischen Region ist es, die Abgabe eines reifen Polypeptids mit maximaler Wirksamkeit, vorzugsweise in nativer Form, in das Kompartiment der Plastiden zu gestatten.

[0017] Die Codiersequenz, die bei dem erfindungsgemäßen chimären Gen verwendet werden kann, stammt von einem Herbizidtoleranzgen beliebigen phylogenetischen Ursprungs. Bei dieser Sequenz kann es sich insbesondere um die mutierte EPSPS-Sequenz mit einem gewissen Grad an Toleranz gegenüber Glyphosate handeln.

[0018] Die Promoterregion gemäß der Europäischen Patentanmeldung 507 698 kann beliebigen Ursprungs sein, in einfacher oder duplizierter Form oder in Form einer Kombination mit einem Gen, das natürlicherweise in den Pflanzen exprimiert wird, vorliegen, das heißt sie kann zum Beispiel bakteriellen Ursprungs sein, wie diejenige des Nopalinsynthasegens, oder viralen Ursprungs sein, wie diejenige des 35S-Transkripts des Blumenkohlmosaikvirus, oder vorzugsweise pflanzlichen Ursprungs sein, wie diejenige der kleinen Untereinheit der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase, oder vorzugsweise wie diejenige eines pflanzlichen Histon-Gens, vorzugsweise von *Arabidopsis thaliana*. Vorzugsweise verwendet man ein Histon-Gen des Typs H3 oder vorzugsweise des Typs H4.

[0019] Das erfindungsgemäße chimäre Gen kann zusätzlich zu den essentiellen oben genannten Teilen eine nicht translatierte Zwischenregion (Linker) zwischen der Promoterregion und der Codierregion sowie zwischen der Codierregion und der Terminatorregion umfassen, die beliebigen phylogenetischen Ursprungs sein kann.

BEISPIEL 1: Konstruktion von chimären Genen

[0020] Erfindungsgemäße chimäre Gene werden mit folgenden Elementen konstruiert:

1) Histongenpromoter: Der Promoter wird aus einem Histonklon mit der Bezeichnung H4A748 von *Arabidopsis thaliana*, Rasse Strasbourg (M. E. Chaboute, Doktorarbeit der Universität Strasbourg, 1987, und M. E. Chaboute et al. (1987) *Plant Mol. Biol.* 8, 179–191) isoliert. Dieser Promoter, der ungefähr 900 Bp zwischen den für seine Isolierung verwendeten Aval-Stellen umfaßt, wurde nach Auffüllen der Sall- und Aval-Überhänge mit Klenow-Polymerase in die per Katalog (Pharmacia Nr. 27-4949-01) erhältliche Sall-II-Stelle von pUC18 subkloniert. Einer der erhaltenen Subklone, dessen 5'-Ende des Promoters in der Nähe der HindIII-Stelle des Polylinkers von pUC18 und das 3'-Ende des Promoters in der Nähe der XbaI-Stelle

des Polylinkers von pUC18 aufweist, wurde für die folgenden Arbeiten verwendet und erhält die folgende Bezeichnung: prom. H4A748/Aval/Sall-pUC18.

2) Transitpeptidregion: Die beiden verwendeten Transitpeptide und die verwendeten reifen Proteinelemente sowie ihr Zusammenbau sind beschrieben worden (M. Lebrun et al., Europäische Patentanmeldung 508 909). Diese Region umfaßt ungefähr 350 Bp und erhält die Bezeichnung Optimiertes Transitpeptid (OTP).

3) Herbizidtoleranzgen CT7: Dieses stammt von dem mutierten Gen CT7 (Pro101 → Ser) der von Stalker et al. (1985) J. Biol. Chem., 260, 4724–4728 isolierten EPSPS aus *Salmonella typhimurium*. Der Klon pGM34-2, der von Calgene stammt, wurde mit XbaI linearisiert und anschließend mit *Vigna radiata*-Nuklease behandelt. Nach erneutem Schneiden mit SmaI wurden die beiden stumpfen Enden ligiert. Der erhaltene Klon besitzt eine NcoI-Stelle auf dem Translationsinitiator ATG sowie eine 17 Bp große Sall-Stelle stromaufwärts des Stop-Codons. Dieser Klon erhielt die Bezeichnung pRPA-BL-104.

4) Fusion TPO/CT7: Eine Expressionskassette, die das optimierte Transitpeptid (OTP) Leserastergerecht in Fusion mit dem CT7-Gen enthält (B. Leroux et al., Europäische Patentanmeldung 507 698), wird in den Vektor pBSII SK(-) (Katalog Stratagene Nr. 212206) kloniert. Diese Kassette 5'-TPO/CT7-3' enthält an ihrem 5'-Ende eine XbaI-Stelle und an ihrem 3'-Ende eine SstI-Stelle.

5) GUS-Reportergen: Es handelt sich um das Gen, das für die β -Glucuronidase (GUS) codiert und das in dem über Katalog (Clontech Nr. 6017-1) erhältlichen Plasmid pBI 101-1 vorliegt.

6) Histon-Terminatorregion: Diese wird von dem Histon-Gen H4A748 aus *Arabidopsis thaliana* (M. E. Chaboute, Doktorarbeit der Universität Strasbourg, 1987, und M. E. Chaboute et al. (1987) Plant Mol. Biol. 8, 179–191) isoliert. Es wurde ein 661 Bp großes Sau3AI-Fragment isoliert, durch Behandlung mit Klenow-Polymerase stumpfend gemacht und in die SmaI-Stelle des Phasmids pBluescript® II KS(+), das über Katalog erhältlich ist (Stratagene Nr. 212207, Short et al., 1988, Nucleic Acid Research 16(15), 7583–7600) subkloniert. Die Sequenz dieses Fragments ist unten in dem Abschnitt „Sequenzbeschreibung“ dargestellt. Durch S1-Kartierung wurde gezeigt, das dieses isolierte Fragment innerhalb einer 200 Bp großen Region ihres 5'-Endes in ursprünglicher Transkriptionsrichtung die Sequenz enthält, die der Sequenz vor der mRNA-Polyadenylierungsstelle, die von der Transkription dieses Gens stammt, entspricht. Das Nukleotid A in Position 165 der 661 Bp großen Sequenz entsprechend der Stelle der Hinzufügung des polyadenylierten Endes liegt auf dem Transkript vor (Chaboute M. E. et al. (1988) Gene, 71, 217–223). Es wurden zwei Subklone zurückbehalten, von denen der eine das in der ursprünglichen Transkriptionsrichtung des Gens H4A748 vorliegende Insert in Form eines SstI-EcoRI-Fragments- mit der Bezeichnung t-directH4A748/Sau3AI/SmaI-pKS- und der andere in umgekehrter Richtung in Form eines SstI-EcoRI-Fragments- mit der Bezeichnung t-inverseH4A748/Sau3AI/SmaI-pKS- aufweist.

Die 661 Bp lange Sequenz der Histon-Terminatorregion H4A748 von *Arabidopsis thaliana* in der ursprünglichen Transkriptionsrichtung des Gens:

```
GATCCGCGTT TGTGTTTCT GGGTTTCTCA CTTAAGCGTC TCGGTTTTAC TTTTGTATTG      60
GGTTTGGCGT TTAGTAGTTT GCGGTAGCGT TCTTGTTATG TGTAATTACG CTTTPTCTTC      120
TTGCTTCAGC AGTTTCGGTT GAAATATAAA TCGAATCAAG TTTCACTTTA TCAGCGTTGT      180
TTTAAATTTT GGCATTAAAT TGGTGAAAAT TGCTTCAATT TTGTATCTAA ATAGAAGAGA      240
CAACATGAAA TTGCACTTTT GACCTCAAAT CTTGGAACAT TTATTTCCCTG ATTTCCAGAT      300
GGATGAGGAT AACGAAAGGG CGGTTCCCTAT GTCCGGGAAA GTTCCCCTAG AAGACAATGA      360
GCAAAGCTAC TGAAACGCGG ACACGACGTC GCATTGGTAC GGATATGAGT TAAACCGACT      420
CAATTCCTTT ATTAAGACAT AAACCGATTT TGGTTAAAGT GTAACAGTGA GCTGATATAA      480
AACCGAAACA AACCGGTACA AGTTTGATTG AGCAACTTGA TGACAAACTT CAGAATTTTG      540
GTTATTGAAT GAAAATCATA GTCTAATCGT AAAAAATGTA CAGAAGAAAA GCTAGAGCAG      600
AACAAAGATT CTATATTCTG GTTCCAATTT ATCATCGCTT TAACGTCCCT CAGATTTGAT      660

```

7) „nos“-Terminatorregion: Es handelt sich um das Fragment, das das Terminatorregionssignal des Nopalinsynthasegens (nos) von pTi37 (Bevan M. et al. (1983) Nucl. Acids Res., 11, 369–385) enthält, das auf dem Plasmid pBI 101-1, das über Katalog erhältlich ist (Clontech Nr. 6017-1), vorliegt.

[0021] Der Zusammenbau von allen diesen Elementen erfolgte folgendermaßen auf Grundlage des Skeletts des Binärenvektors für die Transformation von Pflanzen mittels *Agrobacterium tumefaciens*, pBI 101-1, der über Katalog erhältlich ist (Clontech Nr. 6017-1).

Konstruktion von pRA-1:

[0022] Der Histonpromoter H4A748 von *Arabidopsis thaliana* wurde von dem Plasmid prom.H4A748/AvaI/SalI-pUC18 in Form des ungefähr 900 Bp großen HindIII/XbaI-Fragments herausgeschnitten. Dieses Fragment wurde durch Ligation in das mit HindIII/XbaI verdaute Plasmid pBI 101-1 inseriert. Das erhaltene rekombinante Plasmid enthält in Transkriptionsrichtung des chimären Gens: Promoter H4A748/GUS/nos-Terminatorregion und erhielt die Bezeichnung pRA-1.

Konstruktion von pRA-2:

[0023] Die Terminatorregion H4A748 von *Arabidopsis thaliana* wurde in Form eines ungefähr 670 Bp großen SstI-EcoRI-Fragments aus dem Plasmid t-directH4A748/Sau3AI/SmaI-pKS herausgeschnitten. Dieses Fragment wurde mittels Ligation durch Ersetzen der nos-Terminatorregion nach Verdau des Plasmids pRA-1 mit SstI-EcoRI inseriert. Das erhaltene rekombinante Plasmid enthält in Transkriptionsrichtung des chimären Gens: Promoter H4A748/GUS/Terminatorregion H4A748 in direkter Orientierung und erhielt die Bezeichnung pRA2.

Konstruktion von pRA3.

[0024] Die Terminatorregion H4A748 von *Arabidopsis thaliana* wurde in Form eines ungefähr 670 Bp großen SstI-EcoRI-Fragments aus dem Plasmid t-inverseH4A748/Sau3AI/SmaI-pKS herausgeschnitten. Dieses Fragment wurde mittels Ligation durch Ersetzen der nos-Terminatorregion nach Verdau des Plasmids pRA-1 mit SstI-EcoRI inseriert. Das erhaltene rekombinante Plasmid enthält in Transkriptionsrichtung des chimären Gens: Promoter H4A748/GUS/Terminatorregion H4A748 in umgekehrter Orientierung und erhielt die Bezeichnung pRA3.

Konstruktion von pRPA-RD-146:

[0025] Das ungefähr 1,75 k Bp große XbaI/SstI-Fragment, das OPT/CT7 enthält, wurde durch Ligation durch Ersetzen des GUS-Gens nach Verdau des Plasmids pRA-1 mit XbaI/SstI inseriert. Das erhaltene rekombinante Plasmid enthält in der Transkriptionsrichtung des chimären Gens: Promoter H4A748/OPT/CT7/nos-Terminatorregion und erhielt die Bezeichnung pRPA-RD-146.

Konstruktion von pRPA-RD-147:

[0026] Das ungefähr 1,75 k Bp große XbaI/SstI-Fragment, das OPT/CT7 enthält, wurde durch Ligation durch Ersetzen des GUS-Gens nach Verdau des Plasmids pRA-2 mit XbaI/SstI inseriert. Das erhaltene rekombinante Plasmid enthält in der Transkriptionsrichtung des chimären Gens: Promoter H4A748/OPT/CT7/Terminatorregion H4A748 in direkter Orientierung und erhielt die Bezeichnung pRPA-RD-147.

Konstruktion von pRPA-RD-148:

[0027] Das ungefähr 1,75 k Bp große XbaI/SstI-Fragment, das OPT/CT7 enthält, wurde durch Ligation durch Ersetzen des GUS-Gens nach Verdau des Plasmids pRA-3 mit XbaI/SstI inseriert. Das erhaltene rekombinante Plasmid enthält in der Transkriptionsrichtung des chimären Gens: Promoter H4A748/OPT/CT7/Terminatorregion H4A748 in umgekehrter Orientierung und erhielt die Bezeichnung pRPA-RD-148.

BEISPIEL 2: Expression der Aktivität eines Reportergens

1) Transformation und Regeneration

[0028] Der Vektor wird in der über Katalog (Clontech Nr. 6027-1) erhaltenen nicht onkogenen *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm LBA 4404 dadurch eingeführt, daß man eine Drei-Eltern-Kreuzung mit Hilfe des „helper“-Plasmids pRK 2013 in *Escherichia coli* HB101 nach dem von Bevan M. (1984) Nucl. Acids Res., 12, 8711–8721 beschriebenen Verfahren durchführt.

[0029] Die von Wurzelexplantaten von *Arabidopsis thaliana* L. Ökotyp C24 ausgehende Transformationstechnik wurde nach dem von Valvekens D. et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA, 85, 5536–5540 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Kurzgesagt sind drei Schritte erforderlich: die Induktion der Kallusbildung auf Gamborgs B5-Medium und mit Zusatz von 2,4-D und Kinetin, die Bildung von Knospen auf Gamborgs B5-Medium

mit einem Zusatz von 2iP und IAA, und die Bewurzelung und Samenbildung auf MS ohne Hormone.

2) Bestimmung der GUS-Aktivität in den Pflanzen

a – Histochemische Beobachtungen

[0030] Der Nachweis von GUS-Aktivität (Jefferson R. A. et al. (1987) EMBO J. 6, 3901–3907) an unterschiedlichen Organen von transgenen Pflanzen zeigt, daß die bevorzugte Expression in den Meristemregionen mit den Konstrukten pRA-2 und 3 erhalten bleibt. Weiter läßt sich mit dem Konstrukt pRA-2 eine Aktivität in den ausgewachsenen Geweben (Blättern, Wurzeln, Blütenstielen) beobachten, eine Aktivität, die mit dem Konstrukt pRA-1 nicht aufscheint.

b – Fluorimetrische Messungen

[0031] Die GUS-Aktivität wurde fluorimetrisch an Blütenknospenextrakten und Extrakten der Rosettenblätter (Jefferson R. A. et al. (1987) EMBO J., 6, 3901–3907) an zwölf Pflanzen, die einzelnen Transformationsereignissen entsprechen, gemessen, und zwar für jedes Konstrukt pRA-1, 2 und 3.

[0032] Die in pmol MU/min. mg Protein berechneten durchschnittlichen Ergebnisse lauten folgendermaßen:

<u>Konstrukte</u>	<u>Blätter (B)</u>	<u>Knospen (Kn)</u>	<u>Verhältnis</u> <u>Kn/B</u>
pRA-1	850,25	3965,33	4,66
pRA-2	4890,67	33683,75	6,89
pRA-3	4211,73	27752,45	6,59

[0033] Diese Meßergebnisse zeigen deutlich, daß die Terminatorregion H4A748 in direkter oder umgekehrter Richtung zu einer Erhöhung der Expressionsaktivität des chimären Gens, insbesondere in den Pflanzenregionen mit raschem Wachstum, führt.

BEISPIEL 3: Toleranz von transgenen Pflanzen gegenüber einem Herbizid

1) Transformation und Regeneration

[0034] Der Vektor wird in den über Katalog (Clontech Nr. 6027-1) erhaltenen nicht onkogenen Agrobacterium tumefaciens-Stamm LBA 4404 dadurch eingeführt, daß man eine Drei-Eltern-Kreuzung mit Hilfe des „helper“-Plasmids pRK 2013 in Escherichia coli HB101 nach dem von Bevan M. (1984) Nucl. Acids Res., 12, 8711–8721 beschriebenen Verfahren durchführt.

[0035] Die Transformationstechnik ausgehend von Tabakblattexplantaten beruht auf der von Horsh R. et al. (1985) Science, 227, 1229–1231 beschriebenen Vorgehensweise. Die Regeneration von Tabak PBD6 (Herkunft SEITA-France) aus Blattexplantaten wird auf einem Murashige und Skoog-Basismedium (MS), das 30 g/l Saccharose sowie 200 µg/ml Kanamycin enthält, in drei aufeinanderfolgenden Schritten durchgeführt: der erste umfaßt die Induktion von Sprossen auf MS-Medium unter Zusatz von 30 g Saccharose, das 0,05 mg Naphtyllessigsäure (ANA) und 2 mg/l Benzylaminopurin (BAP) enthält, über einen Zeitraum von 15 Tagen. Die während dieses Schritts gebildeten Sprosse werden anschließend durch Kultivierung auf einem MS-Medium unter Zusatz von 30 g/l Saccharose, jedoch ohne Hormone, über einen Zeitraum von 10 Tagen entwickeln gelassen. Anschließend entfernt man die entwickelten Sprosse und kultiviert sie auf einem halbkonzentrierten MS-Bewurzelungsmedium, mit dem halben Gehalt an Salzen, Vitaminen und Zuckern sowie ohne Hormone. Nach ungefähr 15 Tagen werden die bewurzelten Sprosse in Erde umgesetzt.

2) Messung der Glyphosatetoleranz:

[0036] Für jedes der Konstrukte pRPA-RD-A, B und C wurden 20 transformierte Pflanzen regeneriert und ins Gewächshaus umgesetzt. Diese Pflanzen wurden im 5-Blatt-Stadium im Gewächshaus mit einer wässrigen Roundup®-Suspension, die 0,8 kg Glyphosate-Wirkstoff pro Hektar entspricht, behandelt. Die Ergebnisse stimmen mit der Beobachtung von Phytotoxizitätsindices, die 3 Wochen nach der Behandlung bestimmt wurden, überein. Unter diesen Bedingungen beobachtet man, daß die mit den Konstrukten transformierten Pflanzen im

Durchschnitt eine annehmbare Toleranz (pRPA-RD-146), ja sogar eine gute Toleranz (pRPA-RD-147 und 148) aufweisen, während die nicht transformierten Kontrollpflanzen völlig abgestorben sind.

[0037] Diese Ergebnisse zeigen deutlich die Verbesserung, die durch Verwendung eines erfindungsgemäßen chimären Gens für ein gleiches Gen, das für Glyphosatoleranz codiert, bewirkt wird.

[0038] Die erfindungsgemäß transformierten Pflanzen können als Elternpflanzen für die Gewinnung von Linien und von Hybriden mit dem phänotypischen Merkmal, das der Expression des eingeführten chimären Gens entspricht, verwendet werden.

Patentansprüche

1. Chimäres Gen, das in Transkriptionsrichtung eine Promoterregion, eine Sequenz, die für ein interessierendes agronomisches Protein codiert, und eine Terminatorregion umfaßt, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei der Terminatorregion um eine Terminatorregion eines pflanzlichen Histon-Gens handelt.

2. Chimäres Gen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Terminatorregion in Transkriptionsrichtung des chimären Gens in gleicher oder umgekehrter Richtung in Bezug auf seine ursprüngliche Orientierung in Transkriptionsrichtung des Gens, von dem sie stammt, vorliegt.

3. Chimäres Gen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Histon-Terminatorregion von einer dikotylen Pflanze stammt.

4. Chimäres Gen nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Histon-Terminatorregion von *Arabidopsis thaliana* stammt.

5. Chimäres Gen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Histon-Terminatorregion von einer monokotylen Pflanze stammt.

6. Chimäres Gen nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Histon-Terminatorregion von *Zea mays* stammt.

7. Chimäres Gen nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Histon-Terminatorregion von einem pflanzlichen Histon-Gen H4 stammt.

8. Chimäres Gen nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Histon-Terminatorregion von einem pflanzlichen Histon-Gen H3 stammt.

9. Chimäres Gen nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Promoterregion von einem Promoter eines pflanzlichen Histon-Gens stammt.

10. Chimäres Gen nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Promoterregion von dem gleichen pflanzlichen Histon-Gen wie die Terminatorregion stammt.

11. Chimäres Gen nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Promoterregion einen verdoppelten pflanzlichen Histon-Promoter umfaßt.

12. Chimäres Gen nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Promoterregion mindestens eine Promoterregion von einem pflanzlichen Histon-Gen in Kombination mit einer unterschiedlichen Promoterregion, die von einem Gen, das natürlich in Pflanzen exprimiert werden kann, stammt, enthält.

13. Chimäres Gen nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß man mit der Codiersequenz Pflanzen eine erhöhte Toleranz gegenüber einem Herbizid zu verleihen vermag.

14. Chimäres Gen nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Codiersequenz, die eine Herbizidtoleranz verleiht, mit einer DNA-Sequenz für eine Transitpeptidregion, die eine Anhäufung des Translationsprodukts des Herbizidtoleranzgens in einem subzellulären Kompartiment gestattet, fusioniert ist.

15. Chimäres Gen nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Transitpeptidregion die Anhäufung des Translationsprodukts des Herbizidtoleranzgens im Kompartiment der Plastiden gestattet.

16. Chimäres Gen nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Transitpeptidregion in Transkriptionsrichtung mindestens ein Transitpeptid eines pflanzlichen Gens, das für ein plastidär lokalisiertes Enzym codiert, ggf. einen Teil der Sequenz des reifen n-terminalen Abschnitts eines pflanzlichen Gens, das für ein plastidär lokalisiertes Enzym codiert, sowie ggf. ein zweites Transitpeptid eines pflanzlichen Gens, das für ein plastidär lokalisiertes Enzym codiert, umfaßt.

17. Chimäres Gen nach einem der Ansprüche 13 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß das Herbizidtoleranzgen für ein Enzym, das gegen Herbizide, deren Angriffspunkt die EPSPS ist, aktiv sind, codiert.

18. Chimäres Gen nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß das Herbizidtoleranzgen für ein Enzym, das gegen Glyphosate aktiv ist, codiert.

19. Chimäres Gen nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß das Herbizidtoleranzgen beliebigen phylogenetischen Ursprungs ist.

20. Vektor für die Transformation von Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß er ein chimäres Gen nach einem der Ansprüche 1 bis 19 umfaßt.

21. Agrobacterium sp. Stamm, dadurch gekennzeichnet, daß er einen Vektor nach Anspruch 20 enthält.

22. Transformierte Pflanzenzelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein chimäres Gen nach einem der Ansprüche 1 bis 19 enthält.

23. Transformierte Pflanze, die von einer Zelle nach Anspruch 22 stammt, wobei diese Pflanze das Gen nach den Ansprüchen 1 bis 19 oder den Vektor nach Anspruch 20 enthält.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen