



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 103 18 087 B4 2005.07.28**

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **103 18 087.7**
 (22) Anmeldetag: **17.04.2003**
 (43) Offenlegungstag: **11.11.2004**
 (45) Veröffentlichungstag
 der Patenterteilung: **28.07.2005**

(51) Int Cl.7: **C12N 15/82**

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden.

(71) Patentinhaber:
RWTH Aachen, 52062 Aachen, DE

(74) Vertreter:
Viering, Jentschura & Partner, 46047 Oberhausen

(72) Erfinder:
Schlaich, Nikolaus, Dr., 52159 Roetgen, DE;
Sauerbrunn, Nicolas, 52074 Aachen, DE

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
 gezogene Druckschriften:
Internet-Recherche am
24.03.2004:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>> Accession Number:
NM_113121;
Internet-Recherche am
24.03.2004:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>> Accession Number:
AY088012;
Internet-Recherche am
24.03.2004:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>> Accession Number:
AY074358;

(54) Bezeichnung: **Genetische Kontrolle von Blühzeitpunkt und Pathogenbefall in Pflanzen**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zur Steuerung des Blühzeitpunkts einer transgenen Pflanze, das umfasst:
 (a) Einbringen eines Nukleinsäuremoleküls, das für ein pflanzliches Protein aus der PCC1-Familie von Proteinen kodiert, wobei das Protein eine Aminosäuresequenz umfasst, die aus der Gruppe, bestehend aus SEQ ID Nr. 2, SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 6, SEQ ID Nr. 8, SEQ ID Nr. 10 und SEQ ID Nr. 12, ausgewählt wird, in eine Pflanze, und
 (b) heterologe Expression des Nukleinsäuremoleküls aus (a), um die Aktivität des korrespondierenden Polypeptids nach oben bzw. unten zu regulieren.

```

At3g22231  MNKSRNVEVWVQKPS-YISSGPTSPPPPIGVPRDNYVQDPPAAVENVKGNWPEILMS 59
At3g22240  MNKSRNHIWVWVQKPS-YISSGPTSPPPPIGVPRDNYVQDPPAAVENVKGNWPEILMS 53
At2g32190  YISSYSONQSGRAYTTPFYVTEVYMTFPHLYVPSLISHATVA--FIDNRSKQ-----DG 52
At2g32200  YISSYSONQYA-----YVTEFVWVAPPVLPYVPSLISHATVA--FIDNRSKQ-----DG 48
At2g32210  YISSYSONQSGRAYTTPFYVTEVYVAPPVLPYVPSLISHATVA--FIDNRSKQ-----DG 52
At1g05340  YISSYDNEQSGAGNPPPPMIVTCT-SEFFPTGVFVWQPSHLSVAQGNWPEILMS 53
At3g22231  YISSMECIFVQVCSSELTSE 81
At3g22240  YISSKCAAIQVCSSELTSE 72
At2g32190  YISSFLKGLAAMQVCSSELTSE 71
At2g32200  YISSFLKGLATMIAVCSSELTSE 68
At2g32210  YISSFLKGLAAMQVCSSELTSE 71
At1g05340  YISSFLKGLAAMQVCSSELTSE 72
  
```

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft die genetische Kontrolle des Blühzeitpunkts von Pflanzen. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Steuerung des Blühzeitpunkts einer transgenen Pflanze, das das Einbringen eines Nukleinsäuremoleküls, das für ein pflanzliches Protein aus einer Familie kleiner Proteine, die sowohl den Blühzeitpunkt der Pflanzen regulieren als auch eine erhöhte Resistenz gegen Pathogenbefall vermitteln, kodiert und die heterologe Expression des besagten Nukleinsäuremoleküls, um die Aktivität des korrespondierenden Proteins zu regulieren, umfasst.

Stand der Technik

[0002] Der Übergang von vegetativem Wachstum zur Blüte stellt den wichtigsten Schritt im Entwicklungszyklus einer Pflanze dar, da die zeitliche Kontrolle des Blühzeitpunkts entscheidend für ihren reproduktiven Erfolg ist. Daher haben die meisten Pflanzen zum Teil sehr komplexe Mechanismen entwickelt, um den Blühzeitpunkt abhängig von Umwelteinflüssen sowie dem eigenen Entwicklungsstadium exakt steuern zu können.

[0003] Die molekulargenetische Analyse der Blühzeitpunktkontrolle hat in den letzten Jahren ein mannigfaltig verschaltetes Netzwerk aus verschiedenen Stoffwechselwegen identifiziert, welche die Blütenbildung regulieren (Übersichten in [1–3]). So spielen die Photoperiode, der circadiane Rhythmus, die Lichtqualität, der Einfluss niedriger Temperaturen (Vernalisation), die Verfügbarkeit bzw. Aktivität von Phytohormonen oder auch die Chromatinstruktur für die Kontrolle des Blühzeitpunkts eine wichtige Rolle.

[0004] Die Aufklärung dieser Regulationsmechanismen ist insbesondere bei Kultur- und Nutzpflanzen von großer Bedeutung, um Strategien zur Optimierung des Ertrags entwickeln zu können. Eine Beschleunigung des Blühbeginns könnte zum Beispiel die Aussaat bestimmter Nutzpflanzen auch in Regionen ermöglichen, in denen die Wachstumsaison aufgrund der klimatischen Verhältnisse ansonsten zu kurz wäre. Im Gartenbau ist häufig die Blüte, und nicht der Same oder die Frucht das gewünschte Produkt, sodass auch hier eine schnellere Blütenbildung vorteilhaft wäre. In vielen Fällen ist aber auch eine Verzögerung oder gar Verhinderung der Blütenbildung erwünscht, wie etwa beim Anbau von Grünfüttern (u.a. Alfalfa, Klee), Kohlgewächsen, Spinat oder Salat, um dadurch die Ernteerträge zu steigern. Gleiches gilt für Pflanzen, bei denen die Wurzeln oder Wurzelknollen geerntet werden, also z.B. für Kartoffeln, Karotten oder Zuckerrüben. Bei letzteren würde eine Verhinderung der Blütenbildung weiterhin dazu führen, dass mehr Energie zur Zuckerproduktion verwendet werden könnte als unter normalen Umständen.

den.

[0005] Mittlerweile konnten mehrere Regulatoren der Blühzykluskontrolle identifiziert und molekulargenetisch charakterisiert werden, und zwar primär in *Arabidopsis thaliana*, dem verbreitetsten pflanzlichen Modellorganismus. Das U.S. Patent [4] offenbart die Klonierung und Charakterisierung des LHY-Gens aus *A. thaliana*, dessen Überexpression zur einer verzögerten Blüte unter Langtagbedingungen führt. Der endogene LHY-Promotor reguliert dabei die Transkription in Abhängigkeit vom circadianen Rhythmus und der Photoperiode. Ein weiterer Regulator dieser Gruppe, der "Flowering Locus T" (FT) aus *A. thaliana*, ist in der U.S. Patentanmeldung [5] offenbart. Eine heterologe Überexpression dieses Gens in Pflanzen hat im Vergleich zu Wildtyppflanzen einen deutlich früheren Blühzeitpunkt zur Folge, während die Expression eines FT-Antisensemoleküls eine Verzögerung der Blüte hervorruft. Die internationale Patentanmeldung [6] beschreibt die Isolation und Charakterisierung des Hd3a-Gens, eines Orthologs des FT-Gens im Reis.

[0006] Die Blütenbildung wird auch abhängig vom Entwicklungsstadium der Pflanze gesteuert. Diese Kontrolle erfolgt über den "autonomen" Regulationsweg. Eine Steuerkomponente dieser Stoffwechsellaskade, das RNA-bindende Protein FPA, wird in der Internationalen Patentanmeldung [7] offenbart. Die transgene Expression des FPA-Gens führt dabei zu einer Induktion der Blütenbildung sowohl unter Lang- als auch Kurztagbedingungen. FPA scheint weiterhin auch die Genexpression von FLC zu beeinflussen, einem potentiellen Bindeglied der autonomen und der Vernalisations-abhängigen Kaskade.

[0007] Die Europäische Patentanmeldung [8] beschreibt schließlich die Klonierung und Charakterisierung von MPC1, einem weiteren Regulator der Blütenbildung in *A. thaliana*, sowie seinem Ortholog Os-MPC1 aus Reis. Transgene Pflanzen ohne funktionelles MPC1 bilden unmittelbar nach der Keimung Blüten aus ("super early flowering"). Die Faktoren, welche die Genexpression von MPC1 steuern, sind bislang allerdings noch unklar.

[0008] Obwohl durch die heterologe Expression der oben beschriebenen Regulatoren transgene Pflanzen mit veränderten Blüheigenschaften generiert werden können, sind diese häufig anfälliger gegenüber Umweltfaktoren als vergleichbare Wildtyppflanzen, da eine Verkürzung bzw. Verlängerung der Periode bis zur Blüte einen massiven Eingriff in die Entwicklung einer Pflanze darstellt, der nicht nur mit der gewünschten Änderung des Blühzeitpunkts, sondern auch mit einer Reihe weiterer, phänotypisch oft nicht wahrnehmbarer physiologischer Konsequenzen einhergeht. So muss zum Beispiel eine verfrühte Blüte einer Pflanze unter klimatisch unvorteilhaften Bedin-

gungen nicht zwangsläufig zu den gewünschten höheren Erträgen führen, da der gentechnisch modifizierte Organismus seinem "normalen" Entwicklungszustand "voraus" ist und dadurch aufgrund unzureichend ausgebildeter Schutzmechanismen anfälliger gegen Witterungseinflüsse und insbesondere gegen Schädlingsbefall wird, da für pathogene Organismen wesentlich geringere Barrieren zu überwinden sind.

Aufgabenstellung

[0009] Aufgabe der Erfindung ist es daher, ein neuartiges Verfahren zur Regulation des Blühzeitpunkts von Pflanzen bereitzustellen, mit Hilfe dessen diese Einschränkung umgangen werden kann, sodass nach heterologer Expression dieser Regulatoren die jeweiligen Wirtspflanzen weniger anfällig gegen Pathogenbefall sind.

[0010] Dieses Ziel wird mit Hilfe eines Verfahrens zur Steuerung des Blühzeitpunkts einer transgenen Pflanze gemäß Anspruch 1 über die Expression von regulatorischen Proteinen erreicht, deren funktionelle Aktivität in der Kontrolle des Blühzeitpunkts von Pflanzen und der gleichzeitigen Vermittlung einer erhöhten Resistenz gegen Pathogene liegt.

[0011] Die Erfindung beruht dabei auf dem überraschenden Befund, dass die erzwungene konstitutive Expression der hier offenbarten Proteine aus der PCC1-Familie in Pflanzen nicht nur zu einer deutlich verfrühten Blütenbildung, sondern auch zur Resistenz gegenüber dem Oomyceten *Hyaloperonospora parasitica* (Falscher Mehltau) führte.

[0012] Die Proteine bzw. die korrespondierenden Gene der Erfindung wurden dabei im Rahmen von Mikroarray-Experimenten identifiziert [9]. Gesucht wurde dabei nach Genen, deren Expression in *Arabidopsis thaliana* nach Behandlung mit einem Pathogen (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) erhöht war. Dabei wurde eine cDNA (EST163B24T7) isoliert, deren Expression sich nach der Exposition innerhalb von 10 Minuten um den Faktor drei erhöhte. Weitere Experimente zeigten, dass diese cDNA in unbehandelten Pflanzen auch einer circadianen Kontrolle mit einem Expressionsmaximum am Tagesende unterliegt, die jedoch nach Kontakt mit einem Pathogen zugunsten einer längerfristigen erhöhten Expression aufgehoben wird, d.h. die Pathogenkontrolle ist gegenüber der circadianen Kontrolle epistatisch. Daher wurde das Gen als PCC1 für "Pathogen and Circadian Controlled" bezeichnet.

[0013] Das PCC1-Gen (SEQ ID Nr. 1) ist auf Chromosom 3 von *A. thaliana* lokalisiert (Genlocus-Bezeichnung: At3g22231) und kodiert ein Protein aus 81 Aminosäuren (SEQ ID Nr. 2; Accession Number: NM_113121), zu dem in anderen Organismen keinerlei strukturelle Homologe in den Datenbanken gefun-

den wurden.

[0014] In *A. thaliana* wurden fünf weitere Proteine mit signifikanter Homologie zu PCC1 (33–65% Aminosäureidentität, 41–73% Aminosäureähnlichkeit; siehe [Fig. 1](#)) identifiziert: At3g22240 (SEQ ID Nr. 4), At2g32190 (SEQ ID Nr. 6; Accession Number: AY088012), At2g32200 (SEQ ID Nr. 8), At2g32210 (SEQ ID Nr. 10; Accession Number: AY074358) und At1g05340 (SEQ ID Nr. 12). Die sechs Proteine besitzen neben einer analogen Genstruktur mit drei Exons und zwei Introns nicht nur eine ähnliche Größe (68–81 Aminosäuren), sondern auch zwei hochkonservierte Bereiche im zentralen Bereich der Sequenz (PPP^I_LGYPT bzw. VET^N_KSKG), die auch eine funktionelle Bedeutung dieser Sequenzmotive nahe legen. Detaillierte Struktur-Funktionsanalysen der Proteine liegen bislang allerdings noch nicht vor.

[0015] Die heterologe Expression von PCC1 führt zu einer deutlich verfrühten Blüte der Wirtspflanzen, was in Verbindung mit dem circadianen Muster der Genexpression eine Funktion im Rahmen der Regulation der Photoperiode möglich erscheinen lässt. Die schnellere Induktion der Blütenbildung geht einher mit einer erhöhten Resistenz gegen Pathogenbefall. Der Begriff Pathogen bezeichnet in diesem Zusammenhang einen beliebigen Organismus, der eine Pflanze infizieren und in ihrer Entwicklung beeinträchtigen kann, d.h. phytopathogene Bakterien, Viren, Nematoden, Insekten und Pilze.

[0016] Eine erhöhte Pathogenresistenz einer transgenen Pflanze, in der ein Protein gemäß der Erfindung exprimiert wurde, bezieht sich immer auf den Vergleich mit der unbehandelten Wildtyppflanze. Eingeschlossen in die Erfindung sind daher alle Proteine, die einer transgenen Wirtspflanze neben einem veränderten Blühverhalten eine teilweise oder vollständige Resistenz gegenüber mindestens einem Pathogen verleihen.

[0017] Die Erfindung umfasst Verfahren zur Steuerung des Blühzeitpunkts einer transgenen Pflanze, die das Einbringen eines Nukleinsäuremoleküls, das für PCC1 (At3g22231; SEQ ID Nr. 2; Accession Number: NM_113121), At3g22240 (SEQ ID Nr. 4), At2g32190 (SEQ ID Nr. 6; Accession Number: AY088012), At2g32200 (SEQ ID Nr. 8), At2g32210 (SEQ ID Nr. 10; Accession Number: AY074358) oder At1g05340 (SEQ ID Nr. 12), wobei insbesondere PCC1 (SEQ ID Nr. 2) bevorzugt wird (siehe auch [Fig. 1](#)), kodiert und dessen heterologe Expression um die Aktivität des korrespondierenden Polypeptids nach oben bzw. unten zu regulieren umfasst.

[0018] Die Nukleinsäuremoleküle der Erfindung sind nicht auf Nukleinsäuresequenzen von *Arabidopsis thaliana* beschränkt, sondern schließen alle Nukleinsäuremoleküle ein, die ein Protein gemäß der Er-

findung kodieren. Ein hier gemäß dem Verfahren nach Anspruch 1 verwendetes Nukleinsäuremolekül kann "operativ" mit einer regulatorischen Sequenz verknüpft sein, um die Expression des Nukleinsäuremoleküls zu ermöglichen.

[0019] Ein Nukleinsäuremolekül wird als "fähig zur Expression einer Nukleinsäuresequenz" bezeichnet, wenn es Sequenzelemente umfasst, die Informationen hinsichtlich der Regulation von Transkription und/oder Translation enthalten, und diese Elemente "operativ" mit der das Polypeptid kodierenden Nukleinsäuresequenz verknüpft sind. Eine operative Verknüpfung ist eine Verknüpfung, bei der die regulatorischen Sequenzelemente und die proteinkodierende Sequenz derart verbunden sind, dass Genexpression möglich ist. Die genaue Beschaffenheit der zur Genexpression erforderlichen regulatorischen Bereiche kann zwischen verschiedenen Spezies variieren. In der Regel umfassen diese Bereiche jedoch einen Promotor, der in der Regel aus dem Promotor per se besteht, i.e. DNA-Elemente, welche die Transkriptionsinitiation steuern, sowie aus DNA-Elementen, die nach ihrer Transkription in mRNA den Beginn der Translation regulieren. Solche Promotoren schließen normalerweise 5' nicht-kodierende Sequenzen ein, die an der Initiation von Transkription und Translation beteiligt sind, wie zum Beispiel die -35/-10-Elemente und das Shine-Dalgarno Element in Prokaryonten oder die TATA-Box, CAAT-Sequenzen und 5'-Capping-Elemente in Eukaryonten. Diese Regionen können ferner auch Enhancer- oder Repressorelemente enthalten sowie translatierte Signalsequenzen, um die native Polypeptidkette in ein spezielles Kompartiment der Wirtszelle zu dirigieren. Zusätzlich können auch die 3' nicht-kodierenden Regionen regulatorische Elemente enthalten, die an der Termination der Transkription, der Polyadenylierung o.ä. beteiligt sind. Falls diese Terminationssequenzen in einer speziellen Wirtszelle nicht oder nur unzureichend funktionell sind, können sie durch Signale ersetzt werden, die in der betreffenden Zelle ausreichend funktionell sind.

[0020] Ein Nukleinsäuremolekül gemäß der Erfindung kann demnach eine regulatorische Sequenz, insbesondere eine Promotorsequenz umfassen. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst das Nukleinsäuremolekül gemäß der Erfindung eine Promotorsequenz sowie eine Transkriptionsterminationssequenz. Hinsichtlich der Promotorsequenz kann es sich um einen konstitutiven oder einen induzierbaren Promotor handeln. Geeignete prokaryontische Promotoren sind zum Beispiel der lacUV5-Promotor oder der T7-Promotor. Beispiele für geeignete eukaryontische Promotoren sind der SV40-Promotor oder der CMV-Promotor. Besonders bevorzugt werden jedoch Nukleinsäuremoleküle, die regulatorische Sequenzen aus Pflanzen umfassen [11, 12]. Geeignete pflanzliche Promotoren sind zum

Beispiel die 35S RNA und 19S RNA Promotoren des Cauliflower Mosaic Virus, der durch Licht induzierbare Promotor der kleinen Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase (RUBISCO) oder die Promotoren der Nopalin- und Octopinsynthese auf dem Ti-Plasmid von *Agrobacterium tumefaciens*, die auch in Pflanzen aktiv sind. Ein Beispiel eines pflanzlichen Terminators ist die 3'-untranslatierte Region (UTR) der kleinen RUBISCO Untereinheit. Weiterhin wurden Systeme beschrieben, die eine Expression nach Aufbringen von Substanzen auf die Pflanze (z. B. Steroidhormone) ermöglichen.

[0021] Ein Nukleinsäuremolekül gemäß der Erfindung kann dabei mit der regulatorischen Sequenz in Sense- oder in Antisense-Orientierung verknüpft sein. Eine Verknüpfung in Sense-Orientierung führt zur Transkription eines mRNA-Moleküls und in weiterer Konsequenz zur Synthese eines Polypeptids der PCC1-Familie. Eine Verknüpfung in Antisense-Orientierung dagegen hat die Synthese eines zur mRNA komplementären RNA-Moleküls (i.e. antisense RNA) zur Folge, das als genetisches Werkzeug zur Inhibierung der Genexpression eingesetzt werden kann, wobei auch Fragmente des Nukleinsäuremoleküls zur Inhibierung ausreichen.

[0022] Die Nukleinsäuremoleküle der Erfindung können ferner in einem Vektor oder einem anderen Klonierungsvehikel enthalten sein, wie zum Beispiel Phagen, Phagemiden, Cosmiden, Baculoviren oder künstlichen Chromosomen. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Nukleinsäuremolekül in einem Vektor enthalten, insbesondere in einem Expressionsvektor. Ein derartiger Expressionsvektor kann neben den oben bereits beschriebenen regulatorischen Sequenzen und der Nukleinsäuresequenz, die ein Pflanzenprotein gemäß der Erfindung kodiert, Replikations- und Kontrollsequenzen umfassen, die von einem Organismus stammen, der mit dem zur Expression verwendeten Wirt kompatibel ist, sowie weiterhin mindestens einen Selektionsmarker, der einen selektierbaren Phänotyp auf eine transformierte Zelle überträgt. Eine große Zahl geeigneter Vektoren, z.B. pBluescript, pUC18, pET oder pcDNA3, ist detailliert beschrieben und kommerziell erhältlich. Insbesondere bevorzugt werden Vektoren, die zur Genexpression in Pflanzen geeignet sind. Beispiele derartiger Vektoren sind Ti-Plasmide, Ri-Plasmide, Shuttle-Vektoren wie pPZP221 oder Pflanzenviren, z.B. der Cauliflower Mosaic Virus [11, 12].

[0023] Die Nukleinsäuremoleküle, die ein Protein gemäß der Erfindung kodieren, und insbesondere ein Vektor, der die kodierende Sequenz eines solchen Proteins enthält, können gemäß dem Verfahren aus Anspruch 1 in eine entsprechende Pflanze eingebracht und zur Expression gebracht werden.

[0024] Das Klonieren in einen zur Expression in

Pflanzen geeigneten Vektor kann dabei entweder mit einem Nukleinsäuremolekül, das nur ein Protein aus der PCC1-Familie kodiert, durchgeführt werden oder mit einem Nukleinsäuremolekül, in dem das Protein operativ mit einer regulatorischen Sequenz verknüpft ist. Der so erhaltene rekombinante Vektor kann in der Folge mittels verschiedener etablierter Verfahren in Pflanzenzellen eingebracht werden [11, 12]. Eine routinemäßig verwendete Methode ist die Transformation mittels *Agrobacterium tumefaciens*, einem Bodenbakterium, das in infizierten Pflanzen die Bildung von Wurzelhalsgallen auslöst. Dabei inseriert es einen Teil seiner DNA, die sogenannte T-DNA, die auf dem Ti-Plasmid ("tumor inducing") kodiert ist, in das Genom der Wirtszelle. Durch Insertion einer heterologen DNA in die T-DNA Region verliert das Ti-Plasmid seine Virulenz und kann als "Genfahre" zur Transformation von Pflanzenzellen eingesetzt werden. Alternative Transformationsverfahren umfassen zum Beispiel Elektroporation, Mikroinjektion, DNA-Präzipitation mit Polyethylenglykol und Hochgeschwindigkeitsbeschuss der Zellen mit Partikeln, welche die heterologe DNA in ihrem Inneren oder auf ihrer Oberfläche tragen. An die Transformation schließt sich die Regeneration der vollständigen transgenen Pflanze an. Diese kann u.a. ausgehend von einer einzelnen Pflanzenzelle, einem Protoplasten, Kallus oder Gewebeabschnitt oder dem Samen erfolgen. Nahezu jede Pflanze kann aus Zellen, Geweben oder Teilen vollständig regeneriert werden. Die dazu erforderlichen Techniken sind zum Beispiel in den Übersichten [11, 12] detailliert beschrieben.

[0025] Als "Targetpflanzen" können dabei sowohl monokotyle als auch dikotyle Spezies verwendet werden. Von besonderer Bedeutung sind Kultur- und Nutzpflanzen, bei denen die gezielte Modulation des Blühzeitpunkts bzw. eine erhöhte Pathogenresistenz eine Ertragssteigerung und damit einen wirtschaftlichen Vorteil mit sich bringt. Beispiele solcher Pflanzen sind Getreide (Weizen, Roggen, Hafer, Gerste, Reis, Mais), Kartoffeln, Raps, Sojabohnen, Zuckerrüben, Klee, Karotten, Sonnenblumen oder Baumwolle, oder auch Blütenpflanzen/Schnittblumen.

[0026] Demnach betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Steuerung des Blühzeitpunkts einer transgenen Pflanze, das die folgenden Schritte umfasst:

- (a) Einbringen eines Nukleinsäuremoleküls der Erfindung in eine Pflanze, und
- (b) heterologe Expression des Nukleinsäuremoleküls aus
 - (a), um die Aktivität des korrespondierenden Peptids nach oben bzw. unten zu regulieren.

[0027] Die Regulation der Genexpression kann dabei auf transkriptioneller, post-transkriptioneller, translationeller oder post-translationeller Ebene erfolgen. So kann zum Beispiel durch Einbringen einer zweiten oder weiterer Kopien eines Gens aus der

PCC1-Familie in eine Pflanze die PCC1-Aktivität erhöht werden, was wiederum zu einer schnelleren Induktion der Blütenbildung führt. Die Expression einer Nukleinsäuresequenz, die nur einen Teil eines Proteins gemäß der Erfindung kodiert, kann aber andererseits auch zu einer Verzögerung des Blühzeitpunkts führen, indem dieses Peptid mit der Funktion des endogenen Proteins interferiert. Ein solches Peptid wird als dominant-negative Mutante bezeichnet. Enthält eine Pflanze eine transgene Kopie eines endogenen Gens (bzw. die Kopie eines Fragments davon) in Sense-Orientierung, d.h. in der gleichen Orientierung wie die endogene Kopie, kann dies zu einer transkriptionellen Inaktivierung ("silencing") beider Genkopien führen, weshalb man bei diesem Phänomen auch von Cosuppression spricht (Übersichten in [15, 16]). Alternativ kann die Genexpression eines Nukleinsäuremoleküls der Erfindung aber auch durch die Expression eines Antisensemoleküls herunterreguliert werden (Übersichten in [17, 18]). Ein Antisense-Nukleinsäuremolekül gemäß der Erfindung ist in umgekehrter Orientierung zur endogenen Kopie der Sequenz kloniert. Seine Transkription führt daher zu einem RNA-Molekül, das zur mRNA des endogenen Gens komplementär ist, d.h. diese mRNA binden und deren Translation verhindern kann. In den letzten Jahren wurde mit der RNA-Interferenz (in Pflanzen auch als "posttranscriptional gene silencing" bezeichnet) eine weitere Methode zur Verminderung der Genexpression beschrieben, die auf der Aktivität doppelsträngiger RNA basiert (Übersichten in [19, 20]). Verantwortlich für diesen Prozess sind 21–25 Nukleotide lange siRNAs ("small interfering RNAs"), die an die zu inaktivierende endogene Nukleinsäuresequenz binden und deren Degradation durch Rekrutierung eines spezifischen Enzymkomplexes einleiten. Solche siRNAs können entweder in vivo aus transkribierten DNA-Vorläufermolekülen hergestellt oder chemisch synthetisiert und anschließend in die Zellen eingeschleust werden.

Ausführungsbeispiel

[0028] Die Erfindung wird ferner durch die folgenden nichteinschränkenden Figuren und Beispiele veranschaulicht.

[0029] [Fig. 1](#) zeigt einen multiplen Vergleich der Aminosäuresequenzen von PCC1 (At3g22231) sowie der homologen Proteine At3g22240, At2g32190, At2g32200, At2g32210 und At1g05340. Übereinstimmungen zwischen PCC1 und den jeweiligen Paralogen an einer bestimmten Position sind schwarz unterlegt.

[0030] [Fig. 2](#) zeigt *Arabidopsis thaliana* Wildtyppflanzen (Col-Wt) sowie transgene Pflanzen, die das PCC1 (At3g22231) Gen überexprimieren (PCC1ox). Das PCC1-Gen wurde dabei mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* unter Verwendung etablierter Ver-

fahren in die Pflanzen eingebracht (siehe auch Beispiel 2). PCC1ox-Pflanzen zeigen eine deutlich verfrühte Blüte sowohl unter Kurz- wie auch Langtagbedingungen. Daneben ist auch ein verstärktes Wurzelwachstum sowie ein insgesamt kräftigerer Wuchs erkennbar (wenn auch noch nicht statistisch ausgewertet).

Beispiel 1: Klonierung des PCC1 (At3g322210)-Gens

[0031] Der DNA-Klon, der die Sequenz des PCC1-Gens (Genlocus-Bezeichnung: At3g322231) enthält wurde im Rahmen von Mikroarray-Experimenten isoliert [10]. Der vollständige kodierende Bereich wurde mittels RT-PCR aus Gesamt-RNR von *Arabidopsis thaliana* Col-0 amplifiziert (alle beschriebenen Verfahren sind molekularbiologische Standardmethoden; [13, 14]). Dazu wurden der Titan One-Tube RT-PCR Kit (Roche) entsprechend der Herstelleranweisung und die folgenden Primer verwendet: vorwärts 5'-AAGGATCCAGAATGAATCAATCCGCGC-3' (BamHI-Schnittstelle), rückwärts 5'-AAAAAGTCTGACTTACTCTGTACAGRGGC-3' (Sall-Schnittstelle). Das gereinigte DNA-Fragment wurde mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen gespalten und in den binären Expressionsvektor pCHF1 (erhalten von C. Fankhauser, Universität Genf) kloniert. pCHF1 ist von pZP221 [21] abgeleitet und kodiert den starken 35S CaMV Promotor (EcoRI/SacI-Fragment) stromaufwärts sowie als Terminator die 3'UTR der kleinen Untereinheit von RUBISCO (PstI/HindIII-Fragment) stromabwärts der multiplen Klonierungsstelle.

[0032] Der rekombinante Vektor wurde anschließend in den chemisch kompetenten *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101 (DSM 12365, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) transformiert. Dazu wurden 5 µg Plasmid-DNA mit den aufgetauten Zellen 5 min auf Eis inkubiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1 ml YEP-Medium (1% Hefeextrakt, 1% Pepton, 0.5% NaCl, pH 7.0) zugegeben und die Zellen 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bakterien wurden auf Selektivmedium plattiert, und die Agarplatten drei Tage bei 28°C bebrütet. Transformanten konnten aufgrund ihrer erworbenen Resistenz gegenüber Spectinomycin isoliert werden.

Beispiel 2: Generierung PCC1-überexprimierender transgener Pflanzen

[0033] Die T-DNA von transformierten *Agrobacterium tumefaciens* wurde im Anschluss in *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia (Col-0) Pflanzen transferriert. Dazu wurde die "Floral dip"-Methode [22] verwendet, wobei das zu transformierende Pflanzengewebe in eine Lösung getaucht wird, die transformierte *Agrobacterium tumefaciens* Zellen, 5% (w/v) Sucrose

und 500 µl/l Surfactant Silwet L-77 enthält. Transformierte Pflanzen, die das PCC1-Gen konstitutiv exprimieren (i.e. im Vergleich zum Wildtyp PCC1 überexprimieren), wurden auf MS-Platten "halber Stärke" supplementiert mit 50 µg/ml Gentamicin (Sigma) selektiert. Aus fünf unabhängig transformierten Linien, die eine singuläre T-DNA Insertion tragen (gemäß einer 3:1 Segregation der Gentamicin-Resistenz in der T₂-Generation) wurden homozygote Linien selektiert.

[0034] Die Pflanzen wurden unter kontrollierten Wachstumsbedingungen bei 22°C, etwa 65% relativer Luftfeuchtigkeit und einer Lichtintensität von etwa 150 µE m⁻² sec⁻¹ angezogen (siehe Fig. 2; Col-Wt = Wildtyp, PCC1ox = transgene Pflanzen). Sämtliche PCC1ox-Pflanzen zeigten eine deutlich verfrühte Blüte, insbesondere wenn sie unter permanenter Lichteinstrahlung (i.e. Langtagbedingungen) angezogen wurden. Die PCC1ox-Pflanzen blühten bereits in einem Stadium mit vier echten Blättern, während die Blüte bei den Wildtyppflanzen erst mit 8–10 Blättern erfolgte. Unter Kurztagbedingungen (8.5 h Licht und 15.5 h Dunkelheit) blühten die PCC1ox-Pflanzen ebenfalls signifikant früher als der Col-0 Wildtyp. Die transgenen Pflanzen entwickelten dabei innerhalb von 5–6 Wochen 15–20 Rosettenblätter, bevor sie zu blühen begannen. Wildtyp-Pflanzen benötigten hingegen mehr als zwei Wochen länger, um die gleiche Blütenstandshöhe (1 cm) zu erreichen, und wiesen dabei 30–35 Rosettenblätter auf.

[0035] Während des Wachstums der PCC1ox-Pflanzen auf MS-Platten konnte ferner ein verstärktes Wurzelwachstum beobachtet werden, das nicht nur an der Hauptwurzel, sondern auch an den Seitenwurzeln auftrat, die eine stärkere Verzweigung aufwiesen und längeres Wachstum zeigten. Möglicherweise lässt sich dadurch auch der insgesamt kräftigere Wuchs der transgenen Pflanzen im Vergleich zu den Wildtyppflanzen erklären. Diesbezüglich liegen aber derzeit noch keine statistisch gesicherten Ergebnisse vor.

[0036] Überraschenderweise besaßen die PCC1ox-Pflanzen jedoch eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Oomyceten *Hyaloperonospora parasitica* (Falscher Mehltau). Während das *H. parasitica* Isolat NOCO gegenüber den Wildtyppflanzen virulent ist, waren alle getesteten PCC1ox-Linien dagegen resistent. Unter dem Mikroskop ließ sich lediglich ein sehr begrenztes Hyphenwachstum erkennen. Die Hyphen waren dabei von apoptotischen Pflanzenzellen umgeben – ein klassischer Marker für die Ausbildung einer Resistenz.

[0037] Da die Genexpression von PCC1 sowohl nach Behandlung mit virulenten als auch avirulenten Stämmen von *Pseudomonas syringae* pva. tomato signifikant induziert wird, könnte PCC1 – basierend auf den vorliegenden Ergebnissen – auch eine Rolle

in der basalen Pathogenabwehr der Pflanze spielen. Dementsprechend könnte man bei konstitutiver Expression des PCC1-Gens eine erhöhte Abwehrbereitschaft der Pflanze erwarten, ähnlich dem Phänomen der "systemic acquired resistance" (SAR; [10]). Darunter versteht man den Effekt, dass eine Pflanze nach Abwehr einer Infektion eines nekrotisierenden Pathogens, Vorbehandlung mit β -Aminobuttersäure oder Salicylsäure oder Kontakt mit *Pseudomonas spec.* im Wurzelbereich eine schnellere und verstärkte Antwort auf Pathogenbefall zeigt.

werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Steuerung des Blühzeitpunkts einer transgenen Pflanze, das umfasst:
 - (a) Einbringen eines Nukleinsäuremoleküls, das für ein pflanzliches Protein aus der PCC1-Familie von Proteinen kodiert, wobei das Protein eine Aminosäuresequenz umfasst, die aus der Gruppe, bestehend aus SEQ ID Nr. 2, SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 6, SEQ ID Nr. 8, SEQ ID Nr. 10 und SEQ ID Nr. 12, ausgewählt wird, in eine Pflanze, und
 - (b) heterologe Expression des Nukleinsäuremoleküls aus (a), um die Aktivität des korrespondierenden Polypeptids nach oben bzw. unten zu regulieren.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Aminosäuresequenz aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 2, SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 6, SEQ ID Nr. 8, SEQ ID Nr. 10 und SEQ ID Nr. 12 ausgewählt wird.
3. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 2, wobei die Aminosäuresequenz SEQ ID Nr. 2 ist.
4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 2, wobei das pflanzliche Protein ein Protein- oder Peptidaffinitäsepitop an seinem N- und/oder C-Terminus aufweist.
5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Nukleinsäuremolekül operativ mit einer regulatorischen Sequenz verknüpft ist, um die Expression des Nukleinsäuremoleküls zu ermöglichen.
6. Verfahren gemäß Anspruch 5, wobei das Nukleinsäuremolekül in Sense- oder Antisense-Orientierung mit der regulatorischen Sequenz verknüpft ist.
7. Verfahren gemäß Anspruch 5 oder 6, wobei die regulatorische Sequenz eine Promotorsequenz und eine Transkriptionsterminationssequenz umfasst.
8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das Nukleinsäuremolekül in einem Vektor enthalten ist.
9. Verfahren gemäß Anspruch 8, wobei der Vektor zur Genexpression in Pflanzen adaptiert ist.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Referenzen

- [1] Mouradov, A. et al. (2002) *Plant Cell* 14 Suppl. S111–S130.
- [2] Simpson, G.G. & Dean, C. (2002) *Science* 296, 285–289.
- [3] Yanovsky, M.J. & Kay, S.A. (2003) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 265–276.
- [4] U.S. Patent 6,265,637
- [5] U.S. Patentanmeldung 2002/0029395
- [6] Internationale Patentanmeldung WO 02/42475
- [7] Internationale Patentanmeldung WO 02/12518
- [8] Europäische Patentanmeldung EP 0 967 278 A2
- [9] Scheideler, M. et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 10556ff
- [10] Ryals, J.A. et al. (1996) *Plant Cell* 8, 1809–1819.
- [11] Vasil, I.K. (1984) *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Laboratory Procedures and Their Applications*, Vol. I-III, Academic Press, New York.
- [12] Weisbach, A. & Weisbach, H. (1989) *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, New York.
- [13] Sambrook, J. et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- [14] Ausubel, F.M. et al. (2002) *Short Protocols in Molecular Biology*, 5th Ed., John Wiley & Sons, Hoboken, NJ.
- [15] Baulcombe, D.C. & English, J.J. (1996) *Curr. Opin. Biotechnol.* 7, 173–180.
- [16] Smyth, D.R. (1997) *Curr. Biol.* 7, R793–R795.
- [17] Baker, B.F. & Monia, B.P. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* 1489, 318.
- [18] Brantl, S. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* 1575, 15–25.
- [19] Sharp, P.A. (1999) *Genes Dev.* 13, 139–142.
- [20] Vaucheret, H. et al. (2001) *J. Cell Sci.* 114, 3083–3091.
- [21] Hajdukiewicz, P. et al. (1994) *Plant Mol. Biol.* 25, 989–994.
- [22] Clough, S.J. & Bent, A.F. (1998) *Plant J.* 16, 735–743.

**Es folgt ein Sequenzprotokoll nach WIPO St. 25.
Dieses kann von der amtlichen Veröffentlichungsplattform des DPMA heruntergeladen**

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

At3g22231	MNQSAQNYFSVQKPS-ETSSGPYTSPPPIGYPTRDAVVGDPAAAAVETNSKGVNPEA	IMS	59
At3g22240	MNFSEQNHLSEKPS-QTSSGPYTSPPPIGYPTRDAMVGDPPAAAAVETKSKG-----	DG	53
At2g32190	MSQYSONQSSGAYPTPPVSTGPYMTPPPLGYPTSDISHATVA--PVETKSKG-----	DG	52
At2g32200	MSQYSONQYA-----VSTGPYVAPPPLGYPTNDTTHATVA--PVETKSKG---EA	ADG	48
At2g32210	MSQYSONQSSGAYPTPPVSTGPYVAPPPLGYPTNDTSHATVA--TVETKSKG-----	DG	52
At1g05340	MSQYDHNQSAGANPPPPMSTCT-SPPPPIGYPTNQPSHGSAQGVETKSKG-----	DG	53
At3g22231	CESTCMECIFCCGVCSSLCTSE		81
At3g22240	FWKGCCAAICCCCVLDA-CF--		72
At2g32190	FLKGCLAAMCCCVLDA-CF--		71
At2g32200	FLKGCLATMLACCVLDA-CIF-		68
At2g32210	FLKGCLAAMCCCVLDA-CF--		71
At1g05340	FEKGCCLAAMCCCALDI-CF--		72

Fig. 2

