(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 693 32 974 T2** 2004.05.19

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 640 141 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 32 974.2**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US93/02480**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **93 908 395.2**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 93/019190**
(86) PCT-Anmeldetag: **18.03.1993**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **30.09.1993**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **01.03.1995**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **14.05.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **19.05.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C12N 15/82**
C12N 15/54, C12N 15/60, C12N 15/53, C12N 15/11, A01H 1/00, A01H 5/00, A01H 5/10

(30) Unionspriorität:
855414 **19.03.1992** **US**

(73) Patentinhaber:
E.I. du Pont de Nemours and Co., Wilmington, Del., US

(74) Vertreter:
derzeit kein Vertreter bestellt

(84) Benannte Vertragsstaaten:
DE, DK, FR, GB, IT, NL, SE

(72) Erfinder:
FALCO, Carl, Saverio, Arden, US

(54) Bezeichnung: **NUKLEINSÄUREFRAGMENTE UND VERFAHREN ZUR STEIGERUNG DES LYSIN- UND THREONINGEHALTES DER PFLANZENSAMEN**

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

TECHNISCHES GEBIET

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein einzigartiges synthetisches Nukleinsäureunterfragment, das Aspartokinase (AK) codiert, die gegenüber Hemmung durch Lysin unempfindlich ist. Außerdem werden Methoden zu ihrer Anwendung für die Erzeugung erhöhter Mengen an Lysin oder Threonin in transformierten Organismen gewährt.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Lebensmittel für den Menschen und Tierfutter, die von zahlreichen Getreidesorten kommen, haben ein Defizit an einigen der zehn essentiellen Aminosäuren, die für das Tierfutterregime erforderlich sind. In Mais (Zea mays L.) ist Lysin die am stärksten begrenzende Aminosäure für die Futteranforderungen bei zahlreichen Tieren. Als ein Zusatzstoff für Tierfutter auf Maisbasis wird Sojabohnenmehl (Glycin max L.) als ein Lysin-Ergänzungsstoff verwendet. Eine Erhöhung des Lysingehalts entweder von Mais oder Sojabohnen würde damit die Notwendigkeit zur Ergänzung gemischter Getreidefuttermittel mit Lysin eliminieren oder verringern, das über Fermentation von Mikroben erzeugt wird.

[0003] Die Züchter sind seit langem an einer Verwendung von natürlich auftretenden Variationen zur Verbesserung der Proteinqualität und -menge in Getreidepflanzen interessiert. Mais-Linien, die mehr als normale Mengen an Lysin (70%) enthalten, sind identifiziert worden (Mertz, Science, 145, 279 (1964) und Nelson, Science, 150, 1469–70 (1965)). Diese Linien, in die ein Mutantgen eingebaut ist, Opaque-2, zeigen jedoch schlechtere landwirtschaftliche Qualitäten (erhöhte Anfälligkeit gegenüber Krankheiten und Schädlinge, 8 bis 14% verringerte Ausbeute, geringeres Kerngewicht, langsameres Trocknen, geringere Trockenmahlausbeute von Flocken-bildendem Schrot und erhöhte Lagerprobleme), so dass sie kommerziell nicht verwendbar sind (Deutscher, D. Adv. Exp. Medicine and Biology, lnS, 281–300 (1978)). „Quality Protein Maize" (QPM)-Zuchtsorten ein CIMMMT, die die „Opaque-2"- und „Sugary-2"-Gene und damit zusammenhängende Modifiziermittel verwenden, haben ein hartes Endosperm und angereicherte Mengen an Lysin und Tryptophan in den Kernen [Vasal, S. K., et al. Proceedings of the 3rd seed protein symposium, Gatersleben, 31. August, 2. September, 1983]. Die von den QPM-Linien repräsentierten Genpools sind jedoch tropisch und subtropisch. „Quality Protein Maize" ist ein genetisch kompliziertes Merkmal und die vorhandenen Linien sind nicht leicht an den bestehenden Linien des Keimplasmas anzupassen, die in den Vereinigten Staaten verwendet werden, wodurch die Übernahme von QPM auf Seiten der Getreidezüchter verhindert wird.

[0004] Der Aminosäuregehalt des Saatguts wird hauptsächlich (90 bis 99%) von der Aminosäure-Zusammensetzung der Proteine in dem Samen und bis zu einem geringeren Umfang (1 bis 10%) von dem Pool der freien Aminosäuren bestimmt. Die Menge an Gesamtprotein im Saatgut variiert von etwa 10% der Trockenmasse in den Getreidesorten bis zu 20 bis 40% der Trockenmasse der Hülsen. Der größte Teil der Protein-gebundenen Aminosäuren ist in den Samen-Speicherproteinen enthalten die während der Samenentwicklung synthetisiert werden und die als Hauptnährstoffreserve nach der Keimbildung dienen. In vielen Saatgutarten machen die Speicherproteine 50% oder mehr des Gesamtproteins aus.

[0005] Zur Verbesserung der Aminosäure-Zusammensetzung von Saatgut wird die Gentechnik angewendet, um Gene für Speicherproteine in transgenetischen Pflanzen zu isolieren und exprimieren. Beispielsweise ist ein Gen aus der Brasil-Nuss für ein Samen-2S-Albumin aus 26% Schwefel-enthaltenden Aminosäuren isoliert worden [Altenbach et al. (1987) Plant Mol. Biol. 8: 239–250] und im Saatgut von transformiertem Tabak unter der Kontrolle der regulatorischen Sequenzen von Bohnen-Phaseolin-Speicherprotein-Gen transformiert worden. Die Akkumulation des Schwefel-reichen Proteins in dem Tabaksaatgut führte zu einer bis 30%igen Zunahme in der Menge an Methionin im Saatgut [Altenbach et al. (1989) Plant Mol. Biol. 13: 513–522]. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind jedoch keine Pflanzensaamen-Speicherproteine ähnlich in Lysin relativ zu dem mittleren Lysingehalt von Pflanzenproteinen angereichert identifiziert worden, was diese Vorgehensweise daran hindert, zur Erhöhung von Lysin zum Einsatz zu gelangen.

[0006] Lysin ist zusammen mit Threonin, Methionin und Isoleucin eine Aminosäure, die von Aspartat deriviert ist und die Regulierung der Biosynthese jedes Vertreters dieser Familie miteinander verknüpft. Die Regulierung des Stoffwechselablaufs in dem Stoffwechselweg scheint hauptsächlich über Endprodukte zu erfolgen. Der erste Schritt im Stoffwechselweg ist die Phosphorylierung von Aspartat durch das Enzym Aspartokinase (AK), wobei von diesem Enzym festgestellt worden ist, dass es ein bedeutendes Target für die Regulierung in vielen Organismen ist. Sind jedoch detaillierte physiologische Untersuchungen über den Fluss von 4-Kohlenstoffmolekülen durch den Aspartat-Stoffwechselweg in dem Pflanzenmodell-System Lemna paucicostata ausgeführt worden (Giovanelli et al. (1989) Plant Physiol. 90: 1584–1599]. Die Autoren führen aus: „Diese Daten bieten jetzt einen definitiven Nachweis dafür, dass der Schritt, der durch Aspartokinase katalysiert wird, keine normalerweise entscheidende Stelle für die Regulierung des Eintritts von 4-Kohlenstoffeinheiten in die Aspartatfami-

lie von Aminosäuren ist [bei Pflanzen]".

[0007] Der Stoffwechselweg der Aspartatfamilie wird auch durch Reaktionen an den Verzweigungspunkten reguliert. Bei Lysin ist dieses die Kondensation von Aspartyl-β-semialdehyd mit Pyruvat, katalysiert durch Dihydrodipicolinsäure-Synthase (DHDPS), während bei Threonin und Methionin die Reduktion von Aspartyl-β-semialdehyd durch Homoserin-Dehydrogenase (HDH), gefolgt von der Phosphorylierung von Homoserin durch Homoserin-Kinase (HK) die entscheidende Stellen für die Kontrolle sind.

[0008] Es sind zahlreiche Versuche unternommen worden, um Lysin überproduzierende Mutanten von Pflanzen zu isolieren, indem auf Resistenz gegenüber dem Lysin-Analog S(2-Aminoethyl)-cystein (AEC) entweder allein oder in Verbindung mit Lysin plus Threonin-Resistenz Selektionen selektiert wurde. Allerdings sind bis jetzt noch keine Beispiele von Zunahmen in den Lysinmengen im Samen veröffentlicht worden, die kommerziell auswertbar wären.

[0009] Ein alternatives Vorgehen ist die Erhöhung der Erzeugung und Akkumulation von spezifischen freien Aminosäuren, wie beispielsweise Lysin, auf dem Wege der Gentechnik. Von verschiedenen Quellen ist eine Reihe von Genen für regulatorische Schlüsselenzyme des Stoffwechselweges der Aspartatfamilie isoliert worden. Das E. coli dapA-Gen codiert ein DHDPS-Enzym, das um etwa 20-fach weniger empfindlich gegenüber Hemmung durch Lysin ist als Weizenkeim-DHDPS. Das E. coli dapA-Gen ist mit Pflanzengen-Expressionssequenzen verknüpft worden, über Transformation in Tabakzellen eingeführt worden und gezeigt worden, dass es eine wesentliche Erhöhung der Mengen an freiem Lysin in Blättern bewirkt [Glassman et al. (1989) PCT Patent Appl. PCT/US89/01309]. Es wurde jedoch kein Nachweis dafür erbracht, dass erhöhtes Lysin im Saatgut erhalten wurde (obgleich Saatgut für den Test verfügbar war). Das E. Coli dapA-Gen, das mit den Pflanzengen-Expressionssequenzen verknüpft ist, ist von Galili et al. [(1991) Abstr. 422 from Third Int. Cong. of Int. Soc. Plant Mol. Biol. 1 and by Shaul et al. [(1992) Plant Jour. 2: 203–209] in Tabakzellen eingeführt worden und gezeigt worden, dass eine Erhöhung der Mengen an freiem Lysin in Blättern resultiert. Wiederum ist kein Nachweis dafür vorgelegt worden, dass es erhöhte Mengen an freiem Lysin im Saatgut gibt. Von diesen Autoren wurde neuerdings die Einführung eines E. coli lysC-Gens, das ein Lysin-Unempfindlichkeits-AK-Enzym codiert, in Tabakzellen auf dem Weg der Transformation veröffentlicht worden [Galili et al. (1992) Eur. Patent Appl. 91119328.2; Shaul et al. (1992) Plant Physiol. 100: 1157–1163]. Die Expression des E. coli-Enzyms führt zu Erhöhungen der Mengen an freiem Threonin in den Blättern und Samen von transformierten Pflanzen. Kreuzungen von Pflanzen, die E. coli DHDPS und AK exprimieren, führten zu Nachkommen, die mehr freies Lysin in Blättern akkumulierten als die elterlichen DHDPS-Pflanzen, jedoch weniger freies Threonin in Blättern als elterliche AK-Pflanzen. Es wurde kein Nachweis für erhöhte Mengen an freiem Lysin in Samen geboten.

[0010] Das begrenzte Verständnis der Einzelheiten über die Regulierung des biosynthetischen Stoffwechselweges in Pflanzen machte die Anwendung der Gentechnik und speziell bei Samen unsicher. Es steht wenig Information über die Herkunft des von Aminosäuren in Samen dervierten Aspartats zur Verfügung. So ist beispielsweise bei den meisten Pflanzen unbekannt, ob sie in Samen synthetisiert oder in die Samen von den Blättern transportiert werden oder beides. Darüber hinaus machen freie Aminosäuren lediglich einen geringen Anteil an dem Gesamtgehalt der Aminosäuren von Saatgut aus. Daher muss die Überakkumulation freier Aminosäuren vielfach sein, um die gesamte Aminosäure-Zusammensetzung des Saatguts wesentlich zu beeinflussen. Darüber hinaus ist wenig über den Katabolismus freier Aminosäuren in Samen bekannt. Der Katabolismus von freiem Lysin ist bei der Entwicklung von Endosperm von Mais und Gerste beobachtet worden. Der erste Schritt im Katabolismus von Lysin, so wird angenommen, wird durch Lysin-Ketoglutarat-Reduktase katalysiert [Brochetto-Braga et al. (1992) Plant Physiol. 98: 1139-1147]. Ob derartige katabolische Stoffwechselwege in Pflanzen verbreitet sind und ob sie den Umfang der Akkumulation von freien Aminosäuren beeinflussen, ist unbekannt.

[0011] Vor der Einreichung der vorliegenden Patentanmeldung war keine Methode zur Erhöhung der Menge von Lysin oder irgendeiner anderen Aminosäure in Samen auf gentechnischem Wege bekannt. Es besteht daher ein Bedarf nach Genen, chimären Genen und Methoden zu ihrer Expression in Saatgut, so dass eine Überakkumulation freier Aminosäuren in Saatgut zu einer Verbesserung der Nährmittelqualität führt.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0012] Die vorliegende Erfindung ist ein isoliertes Nukleinsäurefragment, die aufweist: (a) ein erstes Nukleinsäureunterfragment, das AK codiert welches gegenüber Hemmung durch Lysin unempfindlich ist; (b) ein zweites Nukleinsäureunterfragment, das Dihydrodipicolinsäure-Synthase codiert, die mindestens 20-fach geringer empfindlich gegenüber Hemmung durch Lysin ist als Pflanzen-DHDPS; und (c) ein drittes Nukleinsäureunterfragment, das Antisense-Lysin-Ketoglutarat-Reduktase codiert. In einer weiteren Ausführungsform sind die ersten und zweiten Unterfragmente funktionsfähig mit einer geeigneten Pflanzenchloroplast-Transitsequenz verknüpft und jedes Unterfragment ebenfalls mit einer regulatorischen Sequenz verknüpft, um eine Expression in Pflanzen zu fördern. Eine bevorzugte Ausführungsform ist eine der vorstehend beschriebenen Erfindungen, worin sind:

(a) das erste Nukleinsäureunterfragment weist eine Nukleotidsequenz auf, weitgehend homolog der Sequenz gezeigt in SEQ ID Nr: 1, die eine Lysin-unempfindliche Variante von E. coli AKIII codiert, und ferner dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine der folgenden Bedingungen zutrifft:
(1) die Aminosäure an Position 318 ist eine andere Aminosäure als Methionin; oder
(2) die Aminosäure an Position 352 ist eine andere Aminosäure als Threonin; oder
(b) das zweite Nukleinsäureunterfragment ist von Bakterien deriviert.

[0013] Eine weitere Ausführung der Erfindung, worin sind:
(a) das erste Nukleinsäureunterfragment ist ferner dadurch gekennzeichnet, dass mindestens die folgenden Bedingungen zutreffen:
(1) die Aminosäure an Position 3l8 ist Isoleucin oder
(2) die Aminosäure an Position 352 ist Isoleucin; oder
(b) das zweite Nukleinsäureunterfragment ist deriviert von Bakterien und vorzugsweise entweder E. coli oder Corynebakterium alutamicum.

[0014] Ein weiterer Gegenstand schließt außerdem ein isoliertes Nukleinsäurefragment ein, das ein Nukleinsäureunterfragment aufweist, welches Lysin-Ketoglutarat-Reduktase codiert.
[0015] Pflanzen, Samen und Mikroorganismen, die mit den beschriebenen Nukleinsäurefragmenten transformiert sind, sind ebenfalls Ausführungsformen der Erfindung. Weitere Ausführungsformen der Erfindung sind Methoden zur Erhöhung des Gehalts des Threonins oder Lysins von Saatgut durch Transformieren der Pflanzen mit den beschriebenen einzigartigen Nukleinsäurefragmenten.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN UND SEQUENZ-BESCHREIBUNGEN

[0016] Die Erfindung lässt sich anhand der folgenden detaillierten Beschreibung und der beigefügten Zeichnungen und der Sequenz-Beschreibungen besser verstehen, die einen Bestandteil der vorliegenden Patentanmeldung bilden.
[0017] **Fig.** 1 zeigt eine schematische Darstellung von Genexpressionskassetten;
[0018] **Fig.** 2 zeigt eine Karte des binären Plasmidvektors pZS97K;
[0019] **Fig.** 3 zeigt eine Karte des binären Plasmidvektors pZS97;
[0020] **Fig.** 4 zeigt eine Karte des binären Plasmidvektors pZS199;
[0021] **Fig.** 5 zeigt eine Karte des Plasmidvektors pBT603.
[0022] Die SEQ ID Nr: 1 zeigt die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der codierenden Region des Wildtyps E. coli lysC-Gen, das entsprechend der Beschreibung in Beispiel 1 AKIII codiert.
[0023] Die SEQ ID Nr: 2 und 3 wurden in Beispiel 2 zur Erzeugung einer Nco I-Stelle am Translations-Startcodon des E. coli lysC-Gens verwendet.
[0024] Die SEQ ID Nr: 4 und 5 wurden in Beispiel 3 als PCR-Primer für die Isolation des Corynebakterium dapA-Gens verwendet.
[0025] Die SEQ ID Nr: 6 zeigt die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der Codierungsregion des Wildtyp-Corynebakterium dapA-Gens, das Lysin-unempfindliche DHDPS entsprechend der Beschreibung in Beispiel 3 codiert.
[0026] Die SEQ ID Nr: 7 wurde in Beispiel 4 zur Erzeugung einer Nco I-Stelle am Translations-Startcodon des E. coli dapA-Gens verwendet.
[0027] Die SEQ ID Nr: 8, 9, 10 und 11 wurden in Beispiel 6 zur Erzeugung einer Chloroplast-Transitsequenz und Verknüpfung der Sequenz zu den E. coli lysC-M4*, E. coli lysC-M4-, E. coli dapA- und Corynebakteria dapA-Genen verwendet.
[0028] Die SEQ ID Nr: 12 und 13 wurden in Beispiel 6 zur Erzeugung einer Kpn I-Stelle unmittelbar nach dem Translations-Stopcodon des E. coli dapA-Gens verwendet.
[0029] Die SEQ ID Nr: 14 und 15 wurden in Beispiel 6 als PCR-Primer zur Erzeugung einer Chloroplast-Transitsequenz und Verknüpfung der Sequenz zum Corynebakterium dapA-Gen verwendet.
[0030] Die SEQ ID Nr: 16 wurde in Beispiel 6 als eine konstitutive Expressionskassette für Mais verwendet.
[0031] Die SEQ ID Nr: 17 bis 22 wurden in Beispiel 6 zur Erzeugung einer Mais-Chloroplast-Transitsequenz und Verknüpfung der Sequenz zum E. coli lysC-M4-Gen verwendet.
[0032] Die SEQ ID Nr: 23 und 24 wurden in Beispiel 6 als PCR-Primer zur Erzeugung einer Mais-Chloroplast-Transitsequenz und Verknüpfung der Sequenz zum E. coli dapA-Gen verwendet.
[0033] Der Abschnitt „Sequenz-Beschreibungen" enthält den Einbuchstabencode für die Nukleotidsequenz-Merkmale und die Dreibuchstabencode für Aminosäuren entsprechend den IUPAC-IYUB-Standards, die beschrieben sind in „Nucleic Acids Research" 13: 3021–3030(1985) und in dem Biochemical Journal 219 (Nr. 2): 345–373(1984), die hiermit als Fundstellen einbezogen sind.

[0034] Zur Erhöhung der Akkumulation spezifischer freier Aminosäuren in dem Saatgut von Pflanzen mit Hilfe der Gentechnik haben die Anmelder ermittelt, welche Enzyme auf diesem Weg den Stoffwechselweg kontrollieren. Um dabei zum Ziel zu gelangen, wurden Gene aus Bakterien isoliert, die Enzyme auf diesem Weg codieren. In einigen Fällen wurden Mutationen in den Genen erhalten, so dass das codierte Enzym gegenüber einer Endprodukt-Hemmung unempfindlich gemacht wurde. Da die Gene nicht pflanzlicher Herkunft waren, mussten sie mit intrazellulären Lokalisationssequenzen und geeigneten regulatorischen Sequenzen zur Expression in Pflanzen verknüpft werden. Die Gene wurden sodann, ob einzeln oder in Kombinationen, über Transformation in die Pflanzen eingeführt und hinsichtlich ihrer Fähigkeit bewertet, eine Akkumulation der gewünschten Aminosäure(n) in dem/den gewünschten Pflanzenorganen) herauszulocken.

[0035] Die nachfolgenden Lehren beschreiben Nukleinsäurefragmente und Prozeduren, die zur Erhöhung der Akkumulation von Lysin und Threonin in dem Saatgut transformierter Pflanzen im Vergleich zu den Mengen der Aminosäuren von nicht transformierten Pflanzen verwendbar sind. Insbesondere gewähren die Anmelder ein einzigartiges Nukleinsäurefragment, das zwei Nukleinsäureunterfragmente aufweist, von denen das eine AK codiert, das gegenüber einer Hemmung durch Lysin unempfindlich ist, und das andere DHDPS codiert, das mindestens um das 20-fache weniger empfindlich gegenüber einer rückwirkenden Hemmung durch Lysin empfindlich ist als eine typische Pflanzen-DHDPS, z. B. Weizen-DHDPS. Es ist die Kombination von Unterfragmenten, von der der Anmelder festgestellt hat, dass sie das in Saatgut von transformierten Pflanzen im Vergleich zu nicht transformierten Wirtspflanzen akkumulierte Lysin erfolgreich erhöht. Um eine größere Lysin-Akkumulation in Saatgut von transformierten Pflanzen zu erreichen, hat der Anmelder außerdem ein Nukleinsäurefragment bereitgestellt, das ein chimäres Gen der Antisense-Lysin-Ketoglutarat-Reduktase (LKR) enthält. Dieses Fragment lässt sich mit dem ersten Fragment verknüpfen oder auf dem Wege der Kreuzung von Pflanzen kombinieren, die mit dem ersten Fragment transformiert sind, mit Pflanzen, die mit dem Nukleinsäurefragment transformiert sind, das ein chimäres Antisense-LKR-Gen enthält.

[0036] Im Rahmen der vorliegenden Offenbarung muss eine Reihe von Begriffen verwendet werden. Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff „Nukleinsäure" auf ein großes Molekül, bei dem es sich um ein einsträngiges oder doppelsträngiges, aus Monomeren zusammengesetztes (Nukleotide) Molekül handelt, das einen Zucker, Phosphat und entweder ein Purin oder Pyrimidin enthält. Ein „Nukleinsäurefragment" ist eine Fraktion eines vorgegebenen Nukleinsäuremoleküls. Bei höheren Pflanzen ist die Desoxyribonukleinsäure (DNA) das genetische Material, während die Ribonukleinsäure (RNA) beim Transfer der Information in DNA in die Proteine beteiligt ist. Ein „Genom" ist der gesamte Körper des genetischen Materials, das in der jeweiligen Zelle eines Organismus enthalten ist. Der Begriff „Nukleotidsequenz" bezieht sich auf ein Polymer von DNA oder RNA, das einsträngig oder doppelsträngig sein kann und wahlweise synthetische, nicht natürliche oder veränderte Nukleotidbasen enthält, die zum Einbau in DNA- oder RNA-Polymere in der Lage sind.

[0037] Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff „homolog zu" auf die Komplementarität zwischen der Nukleotidsequenz von zwei Nukleinsäuremolekülen oder zwischen den Aminosäuresequenzen zweier Proteinmoleküle. Einschätzungen einer derartigen Homologie werden entweder durch DNA-DNA- oder DNA-RNA-Hybridisierung unter strengen Bedingungen nach dem Verständnis der Fachwelt erzielt [beschrieben in Hames und Higgins (Herausg.) „Nucleic Acid Hybridisation, IRL Press, Oxford, UK]; oder durch den Vergleich der Ähnlichkeit der Sequenz zwischen zwei Nukleinsäuren oder Proteinen.

[0038] Wie hierin verwendet bedeutet „weitgehend homolog" Nukleinsäuremoleküle, die weniger strenge Bedingungen der Hybridisierung erfordern als solche bei homologen Sequenzen, und bezieht sich auch auf die codierende DNA-Sequenz, die bei Baseänderungen beteiligt sein kann, die keine Änderung in der codierten Aminosäure hervorrufen, oder bei Basenänderungen beteiligt ist, die eine oder mehrere Aminosäuren verändern, nicht jedoch die funktionellen Eigenschaften des Proteins beeinflussen, das durch die DNA-Sequenz codiert ist. Damit enthalten die hierin beschriebenen Nukleinsäurefragmente Moleküle, die mögliche Variationen der Nukleotidbasen aufweisen, die von einem Verlust von Genabschnitten, einer Neuanordnung, einer Random- oder kontrollierten Mutagenese des Nukleinsäurefragments umfassen und sogar gelegentliche Nukleotid-Sequenzierungsfehler, so lange wie es sich bei den DNA-Sequenzen um weitgehend homologe handelt.

[0039] „Gen" bezieht sich auf ein Nukleinsäurefragment, das als ein spezifisches Protein exprimiert ist, einschließlich regulatorische Sequenzen, die der codierenden Region vorangehen (5`-nicht codierend) und folgen (3'-nicht codierend). „Natives" Gen bezieht sich auf das Gen, wie es in der Natur mit seinen eigenen regulatorischen Sequenzen angetroffen wird. „Chimäres" Gen bezieht sich auf ein Gen, das heterogene regulatorische und codierende Sequenzen aufweist. „Endogenes" Gen bezieht sich auf das native Gen, das normalerweise in seiner natürlichen Umgebung in dem Genom angetroffen wird. Ein „Fremd"-Gen bezieht sich auf ein Gen, das normalerweise nicht in dem Wirtsorganismus angetroffen wird, das aber durch Gentransfer eingeführt worden ist.

[0040] „Codierende Sequenz" bezieht sich auf eine DNA-Sequenz, die ein spezifisches Protein codiert und die nicht codierenden Sequenzen ausschließt.

[0041] „Startkodon" und „Stopkodon" beziehen sich auf eine Einheit von drei benachbarten Nukleotiden in einer codierenden Sequenz, die die Initiierung und den Kettenabbruch der Proteinsynthese festlegt (mRNA-Translation). „Offenes Leseraster" bezieht sich auf die Aminosäuresequenz, die zwischen dem Translations-Startkodon und -Stopkodon einer codierenden Sequenz codiert ist.

[0042] „RNA-Transkript" bezieht sich auf das Produkt, das sich aus der durch RNA-Polymerase katalysierten Transkription einer DNA-Sequenz ergibt. Wenn das RNA-Transkript eine perfekte komplementäre Kopie der DNA-Sequenz ist, wird es als primäres Transkript bezeichnet, oder es kann eine RNA-Sequenz sein, die von einer posttranskriptionellen Verarbeitung des primären Transkripts deriviert ist. „Messenger-RNA" (mRNA) bezieht sich auf eine RNA, die in ein Protein mit Hilfe der Zelle translatiert werden kann. "cDNA" bezieht sich auf eine doppelsträngige DNA, die zu der mRNA komplementär ist und von dieser deriviert ist. „Sense"-RNA bezieht sich auf ein RNA-Transkript, das die mRNA enthält. „Antisense-RNA" bezieht sich auf ein RNA-Transkript, das zu allen oder zu einem Teil eines primären Target-Transkripts oder mRNA komplementär ist und das die Expression eines Targetgens durch Eingriff in die Verarbeitung, Transport und/oder Translation seines primären Transkripts oder mRNA blockiert. Die Komplementarität einer Antisense-RNA kann mit jedem beliebigen Teil des spezifischen Gentranskripts erfolgen, d. h. an der 5`-nicht codierenden Sequenz, 3'-nicht codierenden Sequenz, Introns oder der codierenden Sequenz. Darüber hinaus kann der Begriff „Antisense-RNA", wie er hierin verwendet wird, Regionen von Ribozym-Sequenzen enthalten, die die Wirksamkeit der Antisense-RNA zur Blockierung der Genexpression erhöhen. „Ribozym" bezieht sich auf eine katalytische RNA und bezieht sequenzspezifische Endoribonukleasen ein.

[0043] Wie hierin verwendet, beziehen sich geeignete „regulatorische Sequenzen" auf Nukleotidsequenzen, die aufwärts (5'), innerhalb und/oder abwärts (3') zu einer codierenden Sequenz liegen, die die Transkription und/oder Expression der codierenden Sequenzen kontrollieren, möglicherweise in Verbindung mit dem Protein-Biosyntheseapparat der Zelle. Diese regulatorischen Sequenzen beziehen Promotoren-, Translations-Führungssequenzen, Transkriptions-Abbruchsequenzen und Polyadenylierungssequenzen ein.

[0044] „Promotor" bezieht sich auf eine DNA-Sequenz in einem Gen, normalerweise seiner codierenden Sequenz vorgelagert (5`), die die Expression der codierenden Sequenz kontrolliert, indem die Erkennung für RNA-Polymerase und andere Faktoren geliefert werden, die zur geeigneten Transkription erforderlich sind. Ein Promotor kann auch DNA-Sequenzen enthalten, die beim Binden von Proteinfaktoren beteiligt sind, die die Wirksamkeit der Transkriptionsauslösung in Reaktion auf physiologische oder entwicklungsbedingte Bedingungen kontrollieren. Es kann ebenfalls Enhancer-Elemente enthalten.

[0045] Ein „Enhancer" ist eine DNA-Sequenz, die die Promotoraktivität stimulieren kann. Dabei kann es sich um ein eingelagertes Element des Promotors oder um ein heterologes Element handeln, das zur Verstärkung der Menge und/oder Gewebespezifizität eines Promotors insertiert ist. „Konstitutive Promotoren" bezeichnen solche, die die Genexpression in allen Geweben und zu jedem Zeitpunkt dirigieren. „Organspezifische" oder „entwicklungsbedingt-spezifische" Promotoren bezeichnen hierin solche, die die Genexpression überwiegend exklusiv in speziellen Organen dirigieren, wie beispielsweise Blätter oder Samen, oder spezifische Entwicklungsstufen in einem Organ, wie beispielsweise einer frühen oder späten Embryogenese.

[0046] Der Begriff „operabel verknüpft" bezieht sich auf Nukleinsäuresequenzen an einem einzigen Nukleinsäuremolekül, die in einem solchen Zusammenhang stehen, dass die Funktion von einer durch die der anderen beeinflusst wird. Beispielsweise ist ein Promotor mit einem Strukturgen operabel verknüpft (d. h. ein Gen, das Aspartokinase codiert, die nach der Vorgabe hierin Lysin-unempfindlich ist), wenn es in der Lage ist, die Expression dieses Strukturgens zu beeinflussen (d. h. dass das Strukturgen unter der transkriptionellen Kontrolle des Promotors steht).

[0047] Der hierin verwendete Begriff „Expression" soll die Erzeugung des Proteinprodukts bedeuten, das durch ein Gen codiert ist. Spezieller bezeichnet „Expression" die Transkription und stabile Akkumulation der Sense-(mRNA) oder der Antisense-RNA, die von dem/den Nukleinsäurefragment(en) der Erfindung deriviert sind, die in Verbindung mit dem Proteinapparat der Zelle zu veränderten Mengen an Proteinprodukt führen. „Antisense-Hemmung" bedeutet die Erzeugung der Antisense-RNA-Transkriptionen, die in der Lage sind, die Expression des Targetproteins zu verhindern. „Überexpression" bezeichnet die Erzeugung eines Genprodukts in transgenen Organismen, mit denen die Erzeugung in normalen oder nicht transformierten Organismen überschritten wird. „Co-Suppression" bedeutet die Expression eines Fremdgens, das weitgehend über eine Homologie zu einem endogenen Gen verfügt und in der Suppression der Expression sowohl des Fremdgens als auch des endogenen Gens führt. „Veränderte Mengen" bezeichnen die Erzeugung von Genprodukten) in transgenen Organismen in Mengen oder Anteilen, die von denen normaler oder nicht transformierter Organismen differieren.

[0048] Die „3`-nicht codierenden Sequenzen" bezeichnet den DNA-Sequenzabschnitt eines Gens, der ein Polyadenylierungssignal enthält und jedes andere regulatorische Signal, das in der Lage ist, die mRNA-Bearbeitung oder -Genexpression zu beeinflussen. Das Polyadenylierungssignal ist gewöhnlich dadurch gekennzeichnet, dass es die Addition von Polyadenylsäure-Trakten an dem 3`-Ende des mRNA-Präkursors beeinflusst.

[0049] Die „Translations-Leader-Sequenz" bezeichnet den DNA-Sequenzabschnitt eines Gens zwischen dem Promotor und der codierenden Sequenz, die in die RNA transkribiert wird und in der vollständig verarbeiteten mRNA vorgelagert (5') zum Translations-Startkodon vorhanden ist. Die Translation-Leader-Sequenz kann die Verarbeitung des primären Transkripts zu mRNA, die mRNA-Stabilität oder den Translationswirkungsgrad beeinflussen.
[0050] „Voll entwickeltes" Protein bezieht sich auf ein nach der Translation verarbeitetes Polypeptid ohne sein Targetsignal. „Präkursor"-Protein bezeichnet das primäre Produkt der Translation von mRNA. Ein „Chloroplast-Targetsignal" ist eine Aminosäuresequenz, die in Verbindung mit einem Protein translatiert ist und dieses in den Chloroplast dirigiert. „Chloroplast-Transitsequenz" bezeichnet eine Nukleotidsequenz, die ein Chloroplast-Targetsignal codiert, „Transformation" bezeichnet hierin die Übertragung eines Fremdgens in das Genom eines Wirtsorganismus und seinen genetisch stabilen Erbmerkmal hinein. Beispiele von Methoden zur Pflanzentransformation schließen die Agrobakterium-vermittelte Transformation ein und die Partikel-beschleunigte oder „Gen-Beschuss"-Transformationstechnologie ein.

ISOLATION VON AK-GENEN

[0051] Das E. coli lysC-Gen ist zum früheren Zeitpunkt bereits geklont, die Restriktionsendonuklease kartiert und sequenziert worden [Cassan et al. (1986) J. Biol. Chem. 261: 1052–1057]. Für die vorliegende Erfindung wurde das lysC-Gen auf einem Bakteriophagen-Lambda-Klon von einer Bank von 3.400 überlappenden Segmenten von geklontem E. coli-DNA erhalten, die von [Kohara et al. (1987) Cell 50: 595-508] aufgebaut wurde. Das E. coli lysC-Gen codiert das Enzym AKIII, das gegenüber Lysin-Hemmung empfindlich ist. Es wurden Mutationen in dem lysC-Gen erhalten, die bewirken, dass das AKIII-Enzym gegenüber Lysin beständig ist.
[0052] Zur Ermittlung der molekularen Basis für die Lysinbeständigkeit wurde die Sequenz des Wildtyp-lysC-Gens und dreier Mutantengene ermittelt. Die Sequenz des geklonten Wildtyp-lysC-Gens, angegeben in SEQ ID Nr: 1:, differiert von der veröffentlichten lysC-Sequenz im codierenden Bereich an den 5-Positionen.
[0053] Die Sequenzen der drei Mutanten der lysC-Gene, die Lysin-unempfindliche Aspartokinase codieren, differierten jeweils von der Wildtyp-Sequenz durch ein einzelnes Nukleotid, was zu einer einzelnen Aminosäure-Substitution in dem Protein führt. Einer der Mutanten (M2) hatte ein A substituiert für ein G am Nukleotid 954 von SEQ ID Nr: 1, was zu einem Isoleucin bei Methionin-Substitution in der Aminosäuresequenz von AKIII führte, während zwei Mutanten (M3 und M4) identische T- für C-Substitutionen am Nukleotid 1055 der SEQ ID Nr: 1 hatten, was zu einem Isoleucin bei Threonin-Substitution führte.
[0054] Es konnten entweder in vivo entsprechend der Beschreibung in Beispiel 1 oder in vitro durch Positions-dirigierte Mutagenese nach Methoden, die in der Fachwelt bekannt sind, anderen Mutationen erzeugt werden, die zu Aminosäure-Substitutionen für den Methionin- oder Threonin-Rest führte, die an diesen Stellen in dem Wildtyp-AKIII vorhanden sind. Von derartigen Mutationen war zu erwarten, dass sie zu einem Lysin-unempfindlichen Enzym führen. Darüber hinaus ließen sich die in Beispiel 1 beschriebenen Methoden mühelos anwenden, um so viele zusätzliche lysC-Mutantengene, die das Lysin-unempfndliche AKIII codieren, zu isolieren und zu charakterisieren, wie gewünscht war.
[0055] Es ist eine Reihe anderer AK-Gene isoliert und sequenziert worden. Diese schließen ein: das thrA-Gen von E. coli [Katinka et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5730–5733], das metL-Gen von E. coli [Zakin et al. (1983) J. Biol. Chem. 258: 3028–3031], das HOM3-Gen von S. cerevisiae [Rafalski et al. (1988) J. Biol. Chem. 263: 2146–2151]. Das thrA-Gen von E. coli codiert ein bifunktionelles Protein, AKI-HDHI. Die AK-Aktivität dieses Enzyms ist gegenüber Lysin unempfindlich, jedoch gegenüber Threonin empfindlich. Das metL-Gen von E. coli codiert ebenfalls bifunktionelles Protein, AKII-HDHII, und die AK-Aktivität dieses Enzyms ist ebenfalls gegenüber Lysin unempfindlich. Das HOM3-Gen von Hefe codiert ein AK, das gegenüber Lysin unempfindlich ist, gegenüber Threonin jedoch empfindlich ist.
[0056] Zusätzlich zu diesen Genen sind mehrere Pflanzengene bekannt, die Lysin-unempfindliches AK codieren. In Gerste sind Lysin-plus-Threonin-beständige Mutanten, die Mutationen in zwei nicht verknüpften Genen tragen, die zu zwei verschiedenen Lysin-unempfindlichen AK-Isoenzymen führen, beschrieben worden described [Bright et al. (1982) Nature 299: 278–279, Rogues et al. (1983) Planta 157: 32–38, Arruda et al. (1984) Plant Phsiol. 76: 442–446]. In Mais hatte eine Lysin-plus-Threonin-beständige Zelllinie eine AK-Aktivität, die weniger empfindlich gegenüber Lysin-Hemmung war als ihre elterliche Linie [Hibberd et al. (1980) Planta 148: 183–187]. Ein danach isolierter Lysin-plus-Threonin-beständiger Maismutant wurde an verschiedenen genetischen Stellen verändert und erzeugte ebenfalls Lysin-unempfindliche AK (Diedrick et al. (1990) Theor. Appl. Genet. 79: 209–215, Dotson et al. (1990) Planta 182: 546–552]. In Tabak gibt es zwei AK-Enzyme in Blättern, von denen eines Lysin-empfindlich ist und das andere Threonin-empfindlich ist. Ein Lysin-plus-Threonin-beständiger Tabakmutant, der ein vollständig Lysin-unempfindliches AK exprimiert, ist beschrieben worden von [Frankard et al. (1991) Theor. Appl. Genet. 82: 273–282]. Diese Pflanzenmutanten könnten als Quellen für Gene dienen, die Lysin-unempfindliches AK codieren und wurden auf der Grundlage der Lehren hierin zur Verstärkung der Akkumulation von Lysin und Threonin in dem Saatgut transformierter Pflanzen verwendet.

[0057] Es ist von einer partiellen Aminosäuresequenz von AK aus Karotten berichtet worden [Wilson et al. (1991) Plant Physiol. 97: 1323: 1328]. Unter Verwendung dieser Information ließ sich eine Reihe von DNA-Oligonukleotiden schaffen, synthetisieren und als Hybridisierungssonden verwenden, um die Isolierung des Karotten-AK-Gens zu ermöglichen. Vor kurzem ist das Karotten-AK-Gen isoliert und seine Nukleotidsequenz bestimmt worden [Matthews et al. (1991) U. S. S. N. 07/746,705]. Dieses Gen kann als eine heterologe Hybridisierungssonde zur Isolierung der Gene verwendet werden, die das vorstehend beschriebene Lysin-unempfindliche AK codieren.

HOCHEXPRESSION VON WILDTYP- UND MUTANTEN-LYSC-GENEN IN E. COLI

[0058] Um eine Hochexpression der lysC-Gene in E. coli zu erreichen, wurde ein bakterieller Expressionsvektor verwendet, der Bakteriophagen-T7-RNA-Polymerase/T7-Promotorsystem einsetzt [Rosenberg et al. (1987) Gene 56: 125–135]. Der Expressionsvektor und das lysC-Gen wurden entsprechend der Beschreibung in Beispiel 2 modifiziert, um einen lysC-Expressionsvektor zu konstruieren. Bei der Expression der Mutanten-lysC-Gene (M2, M3 und M4) wurde das Wildtyp-lysC-Gen durch die Mutantengene entsprechend der Beschreibung in Beispiel 2 ersetzt.

[0059] Bei Hochexpression wird jeder Expressionsvektoren zu einem E. coli-Stamm B121 (DE3) transformiert [Studier et al. (1986) J. Mol. Biol. 189: 113–130]. Es wurden Kulturen aufgezogen, die Expression gestartet, Zellen gesammelt und Extrakte hergestellt, wie in Beispiel 2 beschrieben wird. Der Überstand und die Pellet-Fraktionen von Extrakten aus nicht induzierten und induzierten Kulturen wurden mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und mit Hilfe der AK-Enzymassays analysiert, wie sie in Beispiel 2 beschrieben wurden. Das Hauptprotein, das mit Hilfe der Anfärbung von Coomassie-blau in dem Überstand und den Pellet-Fraktionen von induzierten Kulturen sichtbar war, war AKIII. Es waren etwa 80% des AKIII-Proteins in dem Überstand, und AKIII repräsentiert 10 bis 20% des Gesamtproteins von E. coli in dem Extrakt.

[0060] Es befanden sich näherungsweise 80% der AKIII-Enzymaktivität in der Überstandfraktion. Die spezifische Aktivität von Wildtyp- und Mutanten-Rohextrakten betrug 5 bis 7 Mikromol Produkt pro Minute pro Milligramm Gesamtprotein. Wildtyp AKIII war gegenüber der Anwesenheit von L-Lysin in dem Assay empfindlich. Es wurde eine Hemmung von 50% bei einer Konzentration von etwa 0,4 mMol und 90% Hemmung bei etwa 0,1 mMol ermittelt. Im Gegensatz dazu waren Mutanten-AKIII-M2, -M3 und -M4 von 15 mMol L-Lysin nicht gehemmt.

[0061] Es wurde Wildtyp AKIII-Protein aus Überstand einer induzierten Kultur entsprechend der Beschreibung in Beispiel 2 gereinigt. Gegen das gereinigte AKIII-Protein wurden Kaninchen-Antikörper aufgezogen.

[0062] In der Literatur sind zahlreiche andere mikrobielle Expressionsvektoren beschrieben worden. Der Fachmann müsste in der Lage sein, jede von diesen Konstruktionen von lysC-Expressionsvektoren zu verwenden. Diese lysC-Expressionsvektoren könnten dann in geeignete Mikroorganismen über eine Transformation eingefüllt werden, um ein System für die Hochexpression von AKIII zu schaffen.

ISOLATION VON DHDPS-GENEN

[0063] Es ist bereits das E. coli dapA-Gen (ecodapA geklont, die Restriktionsendonuklease kartiert und sequenziert worden [Richaud et al. (1986) J. Bakteriol. 166: 297–300]. Für die vorliegende Erfindung wurde das dapA-Gen auf einem Bakteriophagen-Lambda-Klon aus einer offiziellen Bank von 3.400 überlappenden Segmenten von geklontem E. coli erhalten. Die DNA wurde von Kohara geschaffen, Akiyama und Isono [Kohara et al. (1987) Cell 50: 595–508]. Das ecodapA-Gen codiert ein DHDPS-Enzym, das gegenüber einer Lysinhemmung empfindlich ist. Allerdings ist es um das 20-fache weniger empfindlich gegenüber einer Hemmung durch Lysin als ein typisches Pflanzen-DHDPS, z. B. Weizenkeim-DHDPS.

[0064] Das Corynebakterium dapA-Gen (cordapA) wurde aus einer Genom-DNA aus ATCC-Stamm 13032 unter der Verwendung einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) isoliert. Die Nukleotidsequenz des Corynebakterium dapA-Gens ist bereits veröffentlich worden [Bonnassie et al. (1990) Nucleic Acids Res. 18: 6421]. Aus der Sequenz war es möglich, Oligonukleotid-Primere für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu schaffen, mit denen die Amplifikation eines DNA-Fragmentes möglich ist, das dieses Gen enthält und zur gleichen Zeit eindeutige Restriktions-Endonukleasestellen am Startkodon und unmittelbar hinter dem Startkodon des Gens hinzufügt, um weitere Konstruktionen zu erleichtern, bei denen das Gen beteiligt ist. Die Einzelheiten der Isolation des cordapA-Gens sind in Beispiel 3 dargestellt. Das cordapA-Gen codiert ein DHDPS-Enzym, das gegenüber Lysinhemmung unempfindlich ist.

[0065] Zusätzlich dazu, dass eine Restriktionsendonukleasestelle am Translations-Startkodon eingeführt wird, änderten die PCR-Primers außerdem das zweite Kodon des cordapA-Gens vom AGC-Codieren auf Serin zu GCT-Codieren auf Alanin. Es sind mehrere geklonte DNA-Fragmente, die aktives, Lysin-unempfindliches DHDPS exprimieren, isoliert worden, was zeigt, dass die zweite Kodon-Aminosäure-Substitution die Enzymaktivität nicht beeinflusst.

[0066] Das PCR-erzeugte Corynebakterium dapA-Gen wurde in den Phagemidvektor-pGEM-9zf(–) von Promega subkloniert und einsträngige DANN erzeugt und sequenziert (SEQ ID Nr: 6). Abgesehen davon, dass sie in den bereits erwähnten zweiten Kodon differenziert wurde, stimmte die Sequenz mit der veröffentlichten Sequenz mit Ausnahme an zwei Stellen, den Nukleotiden 798 und 799, überein. In der veröffentlichten Sequenz waren diese TC, während in den in SEQ ID Nr: 6 gezeigten Gen diese CT sind. Diese Änderung führt zu einer Aminosäure-Substitution von Leucin bei Serin. Die Ursache für diese Differenz ist nicht bekannt. Die Differenz hat keinen offensichtlichen Einfluss auf die DHDPS-Enzymaktivität.

[0067] Die Isolation anderer Gene, die DHDPS codieren, ist in der Literatur beschrieben worden. Zwei Beispiele dafür sind die cDNA, die DHDPS aus Weizen codiert [Kaneko et al. (1990) J. Biol. Chem. 265: 17451–17455] und eine cDNA, die DHDPS aus Mais codiert [Frisch et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 228: 287–293]. Diese Gene codieren Wildtyp-Lysin-empfindliche DHDPS-Enzyme. Allerdings erhielten Negrutui et al. [(1984) Theor. Appl. Genet. 68: 11–20] zwei AEC-resistente Tabakmutanten, worin die DHDPS-Aktivität gegenüber Lysinhemmung weniger empfindlich war als die des Wildtypenzyms. Diese Genen ließen sich unter Anwendung von bereits beschriebenen Methoden zur Isolierung der Weizen- oder Maisgene isolieren oder alternativ unter Anwendung der Weizen- oder Maisgene als heterologe Hybridisierungssonden.

[0068] Vom Fachmann auf dem Gebiet könnten noch andere Gene, die DHDPS codieren, unter Anwendung entweder des ecodapA-Gens, dem cordapA-Gen, oder eines der Pflanzen-DHDPS-Gene als DNA-Hybridisierungssonden isoliert werden. Alternativ könnten andere Gene, die DHDPS codieren, durch funktionelle Komplementierung eines E. coli dapA-Mutanten isoliert werden, wie das bei der Isolation des cordapA-Gens [Yeh et al. (1988) Mol. Gen. Genet. 212: 105–111] und des Mais-DHDPS-Gens der Fall war.

HOCHEXPRESSION DER ECODAPA- UND CORDAPA-GENE IN E. COLI

[0069] Um eine Hochexpression der ecodapA- und cordapA-Gene in E. coli zu erzielen, wurde ein bakterieller Expressionsvektor verwendet, bei dem das Bakteriophagen-T7-RNA-Polymerase/T7-Promotorsystem [Rosenberg et al. (1987) Gene 56: 127–135] verwendet wurde. Der Vektor und die dapA-Gene wurden entsprechend der nachfolgenden Beschreibung modifiziert, um die ecodapA- und cordapA-Expressionsvektoren zu konstruieren.

[0070] Für die Hochexpression wurde jeder der Expressionsvektoren in den E. coli-Stamm BL21 (DE3) [Studier et al. (1986) J. Mol. Biol. 189: 113–130] transformiert. Es wurden Kulturen aufgezogen, die Expression eingeleitet, Zellen gesammelt und Extrakte hergestellt, wie in Beispiel 4 beschrieben wird. Der Überstand und die Pellet-Fraktionen von Extrakten aus nicht induzierten und induzierten Kulturen wurden mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und mit Hilfe der DHDPS-Enzymassays analysiert, die in Beispiel 4 beschrieben werden. Das Hauptprotein, das durch Anfärbung mit Coomassie-blau in den Überstand und den Pellet-Fraktionen beider induzierter Kulturen sichtbar ist, hatte eine relative Molmasse von 32 bis 34 kd, die erwartete Größe für DHDPS. Selbst in nicht induzierten Kulturen war dieses Protein das auffälligste erzeugte Protein.

[0071] In der induzierten Kultur mit dem ecodapA-Gen befand sich etwa 80% des DHDPS-Proteins im Überstand und das DHDPS repräsentierte 10 bis 20% des Gesamtproteins in dem Extrakt. In der induzierten Kultur mit dem cordapA-Gen befand sich mehr als 50% des DHDPS-Proteins in der Pellet-Fraktion. Die Pellet-Fraktionen waren in beiden Fällen 90 bis 95% reines DHDPS mit keinem anderen einzelnen Protein, das in signifikanten Mengen vorlag. Damit waren diese Fraktionen ausreichend rein für die Verwendung in der Erzeugung von Kaninchen-Antikörpern.

[0072] Die spezifische Aktivität von E. coli-DHDPS in der Überstandfraktion von induzierten Extrakten betrug etwa 50 OD_{540}-Einheiten pro Milligramm Protein. E. coli-DHDPS war gegenüber Anwesenheit von L-Lysin in dem Assay empfindlich. Bei einer Konzentration von etwa 0,5 mMol wurden 50% Hemmung ermittelt. Bei Corynebakterium-DHDPS wurde eine Enzymaktivität in der Überstandfraktion von nicht induzierten Extrakten eher als in induzierten Extrakten gemessen. Die Enzymaktivität betrug etwa 4 OD_{530}-Einheiten pro Minute pro Milligramm Protein. Im Gegensatz zur E. coli-DHDPS war die Corynebakterium-DHDPS insgesamt nicht durch L-Lysin selbst bei einer Konzentration von 70 mMol gehemmt.

[0073] In der Literatur sind zahlreiche andere mikrobielle Expressionsvektoren beschrieben worden. Der Fachmann auf dem Gebiet müsste in der Lage sein, jedes von diesen zur Konstruktion, von ecodapA- oder cordapA-Expressionsvektoren zu verwenden. Diese Expressionsvektoren könnten in geeignete Mikroorganismen über eine Transformation zur Schaffung eines Systems für die Hochexpression von DHDPS eingeführt werden.

EXKRETION VON AMINOSÄUREN DURCH E. COLI-EXPRIMIERENDE HOHE MENGEN AN DHDPS UND/ODER AKIII

[0074] Die E. coli-Expressionskassetten wurden in die Expressionsvektoren eingeführt und anschließend in

E. coli-Stamm BL21 (DE3) [Studier et al. (1986) J. Mol. Biol. 189: 113–130] transformiert, um E. coli zur Erzeugung und Exkretion von Aminosäuren zu induzieren. Einzelheiten zu den zur Anwendung gebrachten Prozeduren und Ergebnisse dazu sind in Beispiel 5 dargestellt.

[0075] Andere mikrobielle Expressionsvektoren sind dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt und ließen sich verwenden, um Expressionskassetten für die lysC- und dapA-Gene zu erzeugen und zu kombinieren. Diese Expressionsvektoren ließen sich dann in geeignete Mikroorganismen über Transformation einführen, um alternative Systeme für die Erzeugung und Exkretion von Lysin, Threonin und Methionin zu schaffen.

KONSTRUKTION CHIMÄRER GENE FÜR DIE EXPRESSION VON LYSC- UND DAPA-CODIERENDE REGIONEN IN PFLANZEN

[0076] Die Expression von Fremdgenen in Pflanzen ist gut etabliert [De Blaere et al. (1987) Meth. Enzymol. 143: 277–291]. Ein geeignetes Niveau der Expression von lysC- und dapA-mRNA's kann die Verwendung unterschiedlicher chimärer Gene erfordern, die verschiedene Promotoren nutzen. Derartige chimäre Gene können in Wirtspflanzen entweder gemeinsam in einem einzigen Expressionsvektor übertragen werden oder sequentiell unter Anwendung von mehr als einem Vektor. Eine bevorzugte Klasse von heterologen Wirten zur Expression der codierenden Sequenz von lysC- und dapA-Genen sind eukaryotische Wirte, speziell die Zellen höherer Pflanzen. Besonders bevorzugt unter den höheren Pflanzen und den von ihnen abgeleiteten Samen sind Sojabohne, Rapssamen (Brassica napus, B. campestris), Sonnenblume (Helianthus annus), Baumwolle (Gossypium hirsutum), Mais, Tabak (Nicotiana Tubacum), die Luzerne (Medicago sativa), Weizen (Triticum sp), Gerste (Hordeum vulgare), Hafer (Avena sativa, L.), Sorghum (Sorghum bicolor), Reis (Oryza sativa) und Futtergräser. Die Expression in Pflanzen verwendet in derartigen Pflanzen funktionelle, regulatorische Sequenzen.

[0077] Die Herkunft des Promotors, der zum Antrieb der Expression der codierenden Sequenz gewählt wird, ist so lange nicht entscheidend, wie über ausreichende transkriptionelle Aktivität verfügt werden kann, um die Aufgabe der Erfindung durch Exprimieren von translatierbarer mRNA für lysC- oder dapA-Gene in dem gewünschten Wirtsgewebe zu lösen. Bevorzugte Promotoren zur die Expression in allen Pflanzenorganen und speziell für die Expression in Blättern schließen solche ein, die die 19S- und 35S-Transkripte in Blumenkohl-Mosaikvirus dirigieren [Odell et al.(1985) Nature 313: 810–812; Hull et al. (1987) Virology 86: 482–493], eine kleine Untereinheit von Ribulose-l,5-bisphosphat-Carboxylase [Morelli et awl.(1985) Nature 315: 200; Broglie et al. (1984) Science 224: 838; Hererra-Estrella et al.(1984) Nature 310: 115; Coruzzi et awl. (1984) EMBO J. 3: 1671; Faciotti et al. (1985) Bio/Technology 3: 241], Mais-Zeinprotein (Matzke et al. (1984) EMBO J. 3: 1525] und Chlorophyll-a/b-bindendes Protein [Lampa et awl. (1986) Nature 316: 750–752].

[0078] In Abhängigkeit von der Anwendung kann es wünschenswert sein, Promotoren zu wählen, die für die Expression in der einen von mehreren Pflanzenorganen spezifisch sind. Beispiele schließen die lichtinduzierbaren Promotoren der kleinen Subeinheit von Ribulose-l,5-bisphosphat-Carboxylase ein, wenn die Expression in photosynthetischen Organen gewünscht wird, oder Promotoren, die speziell in Samen aktiv sind.

[0079] Bevorzugte Promotoren sind solche, die die Expression des Proteins spezifisch in Samen ermöglichen. Dieses kann besonders nützlich sein, da Samen die Hauptquelle zur die pflanzlichen Aminosäuren sind und auch deshalb, weil die Samen-spezifische Expression jeden potentiellen nachteiligen Einfluss in nicht zum Samen gehörenden Organen vermeidet. Beispiele für Samen-spezifische Promotoren schließen die Promotoren von Samen-Speicherproteinen ein, ohne auf diese beschränkt zu sein. Die Samen-Speicherproteine sind streng reguliert und zumeist ausschließlich in Samen in besonders organspezifischer und lagenspezifischer Weise exprimiert [Higgins et al. (1984) Ann. Rev. Plant Physiol. 35: 191–221; Goldberg et al. 11989) Cell 56: 149–160; Thompson et al. (1989) BioEssays 10: 108–113]. Darüber hinaus lassen sich verschiedene Samen-Speicherproteine in unterschiedlichen Stufen der Samenentwicklung exprimieren.

[0080] Es gibt derzeit zahlreiche Beispiele für eine samenspezifische Expression von Samen-Speicherprotein-Genen in transgenen dicotyledonen Pflanzen. Diese schließen Gene von dicotyledonen Pflanzen für Bohnen-β-phaseolin ein [Sengupta-Goplalan et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3320-3324; Hoffman et al. (1988) Plant Mol. Biol. 11: 717–729], Bohnen-Lectin [Voellcer et al. (1987) EMBO J. 6: 3571–3577], Sojabohnen-Lectin [Okamwo et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8240–8244], Sojabohnenkunitz-Trypsin-Inhibitor [Perez-Grau et al. (1989) Plant Cell 1: 095–1109], Sojabohnen-β-Conglycinin [Beachy et al. (1985) EMBO J. 4: 3047–3053; Banker et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 458–462; Chen et al. (1988) EMBO J. 7: 297–302; Chen et al. (1989) Dev. Genet. 10: 112–122; Naito et al. (1988) Plant Mol. Biol. 11: 109–123], Erbsen-Vicilin [Higgins et al. (1988) Plant Mol. Biol. 11: 683–695], Erbsen-Convicilin [Newbigin et al. (1990) Planta 180: 461], Erbsen-Legumin [Shirsat et al. (1989) Mol. Gen. Genetics 215: 326]; Rapssamen-Napin [Radke et al. (1988) Theor. Appl. Genet. 75: 685–694] sowie Gene aus monocotyledonen Pflanzen, wie beispielsweise Mais 15kD-Zein [Hoffman et al. (1987) EMBO J. 6: 3213–3221; Schernthaner et al. (1988) EMBO J. 7: 1249–1253; Williamson et al. (1988) Plant Physiol. 88: 1002–1007], Gersten-β-Hordein [Marris et al. (1988) Plant Mol. Biol. 10: 359–366] und Weizen-Glutenin [Colot et al. (1987) EMBO J. 6: 3559–3564]. Außer-

dem bewahren Promotoren von samenspezifischen Genen, die operabel mit heterologen, codierenden Sequenzen in chimären Genkonstrukten verknüpft sind, ebenfalls ihr zeitliches und räumliches Expressionsmuster in transgenen Pflanzen. Beispielsweise enthält Arabidopsis thaliana 2S-Samen-Speicherprotein-Genpromotor zum Exprimieren von Enkephalin-Peptiden in Arabidopsis und B. napus-Samen [Vandekerckhove et al. (1989) Bio/Technology 7: 929–932], Bohnen-Lectin- und Bohnen-β-Phaseolin-Promoteren zum Exprimieren von Luciferase [Riggs et al. (1989) Plant Sci. 63: 47–57] sowie Weizen-Glutenin-Promoteren zum Exprimieren von Chloramphenicolacetyl-Transferase [Colot et al. (1987) EMBO J. 6: 3559–3564].

[0081] Von besonderem Nutzen in der Expression des Nukleinsäurefragments der vorliegenden Erfindung werden die heterologen Promotoren von verschiedenen extensiv charakterisierten Sojabohnensamen-Speicherprotein-Genen sein, wie solchen des Kunitz-Trypsin-Inhibitors [Jofuku et al. (1989) Plant Cell 1: 1079–1093; Perez-Grau et al. (1989) Plant Cell 1: 1095–1109], Glycinin [Nielson et al. (1989) Plant Cell 1: 313–328], [3-Conglycinin [Harada et al. (1989) Plant Cell 1: 415–425]. Von besonderem Nutzen werden Promotoren von Genen für α'- und β-Untereinheiten von Sojabohnen-β-Conglycinin-Speicherprotein speziell beim Exprimieren der lysC- und dapA-mRNA's in den Cotyledonen in den mittleren bis späten Stadien der Entwicklung des Sojabohnensamens sein [Beachy et al. (1985) EMBO J. 4: 3047–3053; Barker et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 458–462; Chen et al. (1988) EMBO J. 7: 297–302; Chen et al. (1989) Dev. Genet. 10: 112–122; Naito et al. (1988) Plant Mol. Biol. 11: 109–123], und zwar in transgenen Pflanzen, da: a) ein sehr geringer Stellungseinfluss auf ihre Expression in transgenen Samen besteht und b) die zwei Promotoren eine unterschiedliche temporale Regulierung zeigen; der Promotor zur das α'-Untereinheitsgen wird wenige Tage vor dem des β-Untereinheitsgens exprimiert.

[0082] Von ebenfalls besonderem Nutzen in der Expression der Nukleinsäurefragmente der vorliegenden Erfindung werden die heterologen Promotoren von mehreren umfangreich charakterisierten Maissamen-Speicherprotein-Genen sein, wie beispielsweise Endosperm-spezifische Promotoren von dem 10 kD-Zein [Kirihara et al. (1988) Gene 71: 359–370], dem 27 kD-Zein [Prat et al. (1987) Gene 52: 51–49; Gallardo et al. (1988) Plant Sci. 54: 211–281], und dem 19 kD-Zein [Marks et al. (1985) J. Biol. Chem. 260: 16451–16459]. Die relativen Transkriptionsaktivitäten dieser Promotoren in Mais sind veröffentlicht worden [Kodrzyck et al. (1989) Plant Cell 1: 105–114] und gewähren eine Grundlage für die Wahl eines Promotors zur Verwendung in den chimären Genkonstrukten bei Mais. Für die Expression in Maisembryos kann der stark Embryo-spezifische Promotor von dem GLB1-Gen verwendet werden [Kriz (1989) Biochemical Genetics 27: 239–251, Wallace et al. (1991) Plant Physiol. 95: 973–975].

[0083] Es wird in Betracht gezogen, dass die Einführung von Enhancern- oder Enhancer-ähnlichen Elementen in andere Promotorkonstrukte ebenfalls erhöhte Mengen an primärer Transkription für lysC- und dapA-Gene gewährt, um die vorliegende Erfindung auszuführen. Damit wären virale Enhancer einbezogen, wie sie beispielsweise in dem 35S-Promotor angetroffen werden [Oden et al. (1988) Plant Mol. Biol. 10: 263–272], Enhancer der Opine-Gene [Fromm et al. (1989) Plant Cell 1: 977–984] oder Enhancer von irgendeiner anderen Quelle, die zu einer erhöhten Transkription führt, wenn sie in einen Promotor eingebaut wird, der operabel mit dem Nukleinsäurefragment der Erfindung verknüpft ist.

[0084] Von besonderer Bedeutung ist das DNA-Sequenzelement, das aus dem Gen für die α'-Untereinheit des β-Conglycinins isoliert wird, das einem konstitutiven Promotor eine 40-fache samenspezifische Verstärkung vermitteln kann [Chen et al. (1988) EMBO J. 7: 297–302; Chen et al. (1989) Dev. Genet. 10: 112–122]. Der Fachmann auf dem Gebiet kann mühelos dieses Element isolieren und in die Promotorregion jedes beliebigen Gens einsetzen, um eine samenspezifisch verstärkte Expression mit dem Promotor in transgenen Pflanzen zu erhalten. Der Einsatz eines solchen Elementes in ein beliebiges samenspezifisches Gen, das zu anderen Zeitpunkten exprimiert ist als das β-Conglycinin-Gen, wird zu einer Expression in transgenen Pflanzen für eine längere Dauer während der Samenentwicklung führen.

[0085] Um die vorliegende Erfindung auszuführen, kann jede beliebige 3`-nicht codierende Region, die in der Lage ist, ein Polyadenylierungssignal zu gewähren, sowie andere regulatorische Sequenzen verwendet werden, die für die geeignete Expression der lysC- oder dapA-codierenden Regionen erforderlich sind. Dann einbezogen wäre das 3`-Ende jedes beliebigen Speicherproteins, wie beispielsweise das 3`-Ende des Bohnen-Phaseolin-Gens, das 3`-Ende des Sojabohnen-β-Conglycinin-Gens, das 3`-Ende von viralen Genen, wie beispielsweise das 3`-Ende der 35S- oder der 19S-Blumenkohl-Mosaikvirus-Transkripte, das 3`-Ende von Opine-Synthesegenen, die 3`-Enden von Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase- oder Chlorophyll-a/bbindenen Protein, oder 3`-Endsequenzen jeder beliebigen Quelle, wie beispielsweise die Sequenz, die eingesetzt wird, um die erforderliche regulatorische Information innerhalb der Nukleinsäuresequenz zu schaffen, um zu der geeigneten Expression der Kombination der Promotor/lysC-codierenden Region zu führen, mit der es operabel verknüpft ist. Dieses sind zahlreiche Beispiele, die die Brauchbarkeit der unterschiedlichen 3`-nicht codierenden Regionen lehren [beispielsweise siehe Ingelbrecht et al. (1989) Plant Cell 1: 671–680].

[0086] Die DNA-Sequenzen, die auf intrazellulare Lokalisationssequenzen codieren, können der lysC- und dapA-codierenden Sequenz hinzugefügt werden, sofern dies für die geeignete Expression der Proteine erforderlich ist, um die vorliegende Erfindung auszuführen. Von Pflanzen-Aminosäure-biosynthetischen Enzymen

ist bekannt, dass sie in Chloroplasten angeordnet sind und daher mit einem Chloroplast-Targetsignal synthetisiert werden. Bakterielle Proteine, wie beispielsweise DHDPS und AKIII, verfügen über kein derartiges Signal. Eine Chloroplast-Transitsequenz könnte daher mit den dapA- und lysC-codierenden Sequenzen verschmolzen werden. Bevorzugte Chloroplast-Transitsequenzen sind solche mit kleiner Untereinheit von Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase, z. B. von Sojabohnen [Berry-Lowe et al. (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1: 483–498] zur Verwendung in dicotyledonen Pflanzen und von Mais [Lebrun et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15: 4360] zur Verwendung in monocotyledonen Pflanzen.

EINFÜHRUNG VON LYSC- UND DAPA-CHIMÄREN GENEN IN PFLANZEN

[0087] Es stehen zahlreiche Methoden zum Einführen einer DNA-Sequenz (d. h. eines Transformierens) in eukaryotische Zellen höherer Pflanzen dem Fachmann auf dem Gebiet zur Verfügung (siehe die EP-A-0 295 959 A2 und 0 138 341 A1). Diese Methoden schließen solche ein, die auf der Transformation von Vektoren auf der Grundlage von Ti- und Ri-Plasmiden von Aerobakterium spp beruhen. Besonders bevorzugt ist die Verwendung des binären Typs dieser Vektoren. Ti-derivierte Vektoren transformieren eine große Vielzahl höherer Pflanzen, einschließlich monocotyledoner und dicotyledoner Pflanzen, wie beispielsweise Sojabohne, Baumwolle und Raps [Pacciotti et al. (1985) Bio/Technology 3: 241; Byrne et al. (1987) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 8: 3; Sukhapinda et al. (1987) Plant Mol. Biol. 8: 209–216; Lorz et al. (1985) Mol. Gen. Genet. 199: 178; Potrykus (1985) Mol. Gen. Genet. 199: 183].

[0088] Bei der Einführung in Pflanzen lassen sich die chimären Gene der Erfindung in binäre Vektoren einsetzen, wie sie beispielsweise in den Beispielen 7 bis 12 und 14 bis 16 beschrieben wurden. Die Vektoren sind Teil eines binären Ti-Plasmidvektorsystems [Bevan, (1984) Nucl. Acids. Res. 12: 8711–8720] von Agrobakterium tumefaciens.

[0089] Dem Fachmann auf dem Gebiet sind auch andere Transformationsmethoden verfügbar, wie beispielsweise die direkte Aufnahme von Fremd-DNA-Konstrukten [die EP-A-0 295 959 A2], Methoden der Elektroporation [siehe Fromm et al. (1986) Nature (London) 319: 791] oder der Hochgeschwindigkeitsbeschuss mit Metallpartikeln, die mit Nukleinsäurekonstrukten beschichtet sind [siehe Kline et al. (1987) Nature (London) 327: 70, und siehe die US-P-4 945 050]. Sobald sie transformiert sind, lassen sich die Zellen vom Fachmann auf dem Gebiet regenerieren.

[0090] Von besonderer Relevanz sind die neuerlich beschriebenen Methoden des Transformierens von Fremdgenen in kommerziell bedeutende Nutzpflanzen, wie beispielsweise Rapssamen [siehe De Block et al. (1989) Plant Physiol. 91: 694–701], Sonnenblume [Everett et al. (1987) Bio/Technology 5: 1201], Sojabohne [McCabe et al. (1988) Bio/Technology 6: 923; Hinchee et al. (1988) Bio/Technology 6: 915; Chee et al. (1989) Plant Physiol. 91: 1212–1218; Christou et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci USA 86: 7500-7504; EP-A-0 301749 A2], und Mais [Gordon-Kamm et al. (1990) Plant Cell 2: 603–618; Fromm et al. (1990) Biotechnology 8: 833–839].

[0091] Bei der Einführung in Pflanzen durch Hochgeschwindigkeitsbeschuss lassen sich die chimären Gene der Erfindung in geeignete Vektoren einsetzen, wie sie in Beispiel 6 beschrieben wurden. Transformierte Pflanzen können entsprechend der Beschreibung in den Beispielen 17 bis 19 erhalten werden.

EXPRESSION VON LYSC- UND DAPA-CHIMÄREN GENEN IN PFLANZEN

[0092] Zur Analyse der Expression der chimären Gene in Blättern und Samen der transformierten Pflanzen können die AKIII- oder DHDPS-Proteine detektiert und quantitativ enzymatisch und/oder immunologisch mit Hilfe von Methoden nachgewiesen werden, die dem Fachmann auf dem Gebiet vertraut sind. Auf diese Weise lassen sich mühelos Linien identifizieren, die große Mengen an exprimiertem Protein erzeugen.

[0093] Um die Zusammensetzung der freien Aminosäure der Blätter zu messen, können freie Aminosäuren mit Hilfe zahlreicher Methoden extrahiert werden, wie solche, die in die Beschreibung von Beispiel 7 einbezogen sind. Um die Zusammensetzung hinsichtlich freier oder der Gesamtaminosäure zu messen, können Extrakte nach verschiedenen Methoden hergestellt werden, einschließlich derjenigen, wie sie in Beispiel 8 beschrieben wurden.

[0094] Es gab keinen signifikanten Einfluss der Expression von AKIII oder AKIII-M4 (mit einem Chloroplast-Targetsignal) auf die Mengen an freiem Lysin oder Threonin (oder irgendeiner anderen Aminosäure) in den Blättern (siehe Tabelle 2 in Beispiel 7). Da AKIII-M1 auf die Feedback-Hemmung durch irgendeines der Endprodukte des Stoffwechselweges unempfindlich ist, zeigt dieses, dass bei anderen Schritten in dem biosynthetischen Stoffwechselweg in Blättern eine Kontrolle ausgeübt werden muss.

[0095] Im Gegensatz dazu führt die Expression des AKIII oder AKIII-M4 (mit einem Chloroplast-Targetsignal) in den Samen zu 2- bis 4-facher oder 4- bis 23-facher Erhöhung der Menge an freiem Threonin in dem Samen im Vergleich zu nicht transformierten Pflanzen und zu 2- bis 3-facher Erhöhung der Menge an freiem Lysin in einigen Fällen (Tabelle 3, Beispiel 8). Es gab eine gute Korrelation zwischen Transformanten, die größere Men-

gen an AKIII- oder AKIII-M4-Protein exprimieren, und solchen mit größeren Mengen an freiem Threonin, was bei Lysin jedoch nicht der Fall war. Die relativ kleinen Zunahmen an freiem Threonin oder Lysin, die mit dem AKIII-Protein erzielt wurden, waren nicht ausreichend, um detektierbare Zunahmen im Vergleich zu nicht transformierten Pflanzen zu erzielen, und zwar hinsichtlich der Mengen an Gesamtthreonin oder -lysin in dem Samen. Die größeren Zunahmen an freiem Threonin, die über Expression von AKIII-M4-Protein erzielt wurden, waren ausreichend, um detektierbare Erhöhungen im Vergleich zu Samen von nicht transformierten Pflanzen hinsichtlich der Mengen an Gesamtthreonin in dem Samen zu erzielen. Es wurden 16 bis 25% Zunahmen des Gesamtgehalts an Threonin des Samens beobachtet. Die Linien, die ein erhöhtes Gesamtthreonin zeigten, waren die gleichen, die höhere Werte der Zunahme an freiem Threonin und eine hohe Expression des AKIII-M4-Protein zeigten.

[0096] Die vorstehend ausgeführten Lehren zeigen, dass in Samen eine Aminosäure-Biosynthese stattfindet und diese durch die Expression von Fremdgenen moduliert werden kann, die Aminosäure-biosynthetische Enzyme codieren. Darüber hinaus zeigen sie, dass eine Kontrolle eines Aminosäure-biosynthetischen Weges sich erheblich von einem Pflanzenorgan zu einem anderen unterscheiden kann, z. B. Samen und Blätter. Die Bedeutung dieser Beobachtung wird bei Betrachtung der unterschiedlichen Einflüsse des Exprimierens einer Fremd-DHDPS in Blättern und Samen entsprechend der nachfolgenden Beschreibung betont. Es kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Threonin-Biosynthese in Samen hauptsächlich über die Endprodukt-Hemmung von AKA kontrolliert wird. Daher kann eine Threoninakkumulation in dem Samen von Pflanzen durch Expression eines Gens erhöht werden, das über Transformation eingeführt wird, das AK codiert, das gegenüber Lysinhemmung unempfindlich ist, und das in dem Chloroplast lokalisiert ist.

[0097] Die vorstehend ausgeführten Lehren demonstrieren außerdem, dass transformierte Pflanzen, die höhere Mengen des eingeführten Enzyms in Samen exprimieren, höhere Mengen an freiem Threonin in Samen akkumulieren. Darüber hinaus demonstrieren die Lehren, dass transformierte Pflanzen, die ein Lysin-unempfindliches AK in Samen exprimieren, höhere Mengen an freiem Threonin in Samen akkumulieren als das bei transformierten Pflanzen der Fall ist, die ähnliche Mengen einer Lysin-empfindlichen AK exprimieren. Um die kommerziell bedeutenden Zunahmen an freiem Threonin zu erreichen, wird eine vollständig Lysin-unempfindliche AK bevorzugt.

[0098] Diese Lehren zeigen, dass die Mengen an freiem Lysin in Samen die Akkumulation einer anderen, von Aspartat derivierten Aminosäure, Threonin, durch Endprodukt-Hemmung von AK kontrollieren. Um hohe Mengen an freiem Lysin selbst zu akkumulieren, ist es erforderlich, die Lysinhemmung von AK über die Expression einer Lysin-unempfindlichen AK zu umgehen.

[0099] Die Expression von aktivem E. coli-DHDPS-Enzym wurde sowohl in jungen als auch in voll entwickelten Blättern der transformierten Tabakpflanzen erreicht (Tabelle 4, Beispiel 9). Hohe Mengen an freiem Lysin, 50- bis 100-fach höher als in normalen Tabakpflanzen, die in jungen Blättern der Pflanzen akkumuliert waren, exprimieren das Enzym mit einem Chloroplast-Targetsignal, nicht jedoch ohne ein Targetsignal. Eine sehr viel kleinere Akkumulation von freiem Lysin (2- bis 8-fach) wurde in größeren Blättern beobachtet. Versuche, das Lysin in dem Phloem zu messen, legen nahe, dass Lysin aus den großen Blättern exportiert wird. Dieses exportierte Lysin kann zu der Akkumulation von Lysin in den kleinen noch wachsenden Blättern beitragen, von denen bekannt ist, dass sie Nährstoffe aufnehmen anstatt sie zu exportieren. Es wurde kein Einfluss auf die Mengen an freiem Lysin in den Samen dieser Pflanzen selbst dann beobachtet, wenn E. coli-DHDPS-Enzym in dem Samen sowie in den Blättern exprimiert war.

[0100] Hohe Mengen an samenspezifischer Expression von E. coli-DHDPS-Enzym entweder mit oder ohne ein Chloroplast-Targetsignal hatten keinen Einfluss auf die Zusammensetzung hinsichtlich des gesamten oder freien Lysins oder Threonins (oder irgendeiner anderen Aminosäure) der Samen in irgendeiner transformierten Linie (Tabelle 5, Beispiel 10). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die Expression in Samen eines DHDPS-Enzyms, das gegenüber Lysin weniger empfindlich ist als das Pflanzenenzym, nicht ausreicht, um zu einer erhöhten Produktion oder Akkumulation von freiem Lysin zu gelangen.

[0101] Diese Lehren aus Transformanten, die das E. coli-DHDPS-Enzym exprimieren, zeigen, dass die Lysin-Biosynthese in Blättern hauptsächlich über die Endprodukt-Hemmung von DHDPS kontrolliert ist, während es in Samen mindestens eine zusätzliche Stelle der Kontrolle in dem Stoffwechselweg geben muss. Diese Lehren aus Transformanten, die die E. coli-AKIII- und -AKIII-M4-Enzyme exprimieren, zeigen, dass die Menge an freiem Lysin in Samen die Akkumulation sämtlicher von Aspartat derivierter Aminosäuren durch die Endprodukt-Hemmung von AK kontrolliert. AK ist daher eine zusätzliche Kontrollstelle.

[0102] Um gleichzeitig eine Hochexpression sowohl von E. coli-DHDPS als auch AKIII-M4 in Blättern und Samen zu erzielen, könnten Pflanzen, die jedes der Gene exprmieren, gekreuzt werden und Hybride, die beide exprimieren, gewählt werden.

[0103] Eine andere Methode wäre die Konstruktion von Vektoren, die beide Gene an dem selben DNA-Fragment enthalten, und das Einführen der verknüpften Gene in die Pflanzen über Transformation. Dieses wird deshalb bevorzugt, weil die Gene während der anschließenden Zuchtversuche der Pflanze verknüpft bleiben würden. Repräsentative Vektoren, die beide Gene an dem gleichen DNA-Fragment tragen, werden in den Bei-

spielen 11, 12, 16 und 18 beschrieben.

[0104] In Beispiel 11 werden Tabakpflanzen beschrieben, die mit einem Vektor transformiert sind, der sowohl E. coli-DHDPS- als auch AKIII-M4-Gene verknüpft mit dem 35S-Promotor trägt. In Transformanten, die wenig oder kein AKIII-M4 exprimieren, bestimmt der Wert der Expression von E. coli-DHDPS die Menge der Lysin-Akkumulation in Blättern (Beispiel 11, Tabelle 6). In Transformanten jedoch, die sowohl AKIII-M4 als auch E. coli-DHDPS exprimieren, spielt die Größe der Expression jedes Proteins eine Rolle beim Kontrollieren der Menge der Lysin-Akkumulation. Transformierte Linien, die DHDPS in vergleichbaren Mengen exprmieren, akkumulieren mehr Lysin, wenn ebenfalls AKIII-M4 exprimiert ist (Tabelle 6, vergleiche Zeilen 564-18A, 564-56A, 564-36E, 564-55B und 564-47A). Somit erhöht die Expression einer Lysin-unempfindlichen AK die Lysinakkumulation in Blättern, wenn sie gemeinsam mit einem DHDPS-Enzym exprimiert ist, das 20-fach weniger empfindlich gegenüber Lysin als das endogene Pflanzenenzym ist.

[0105] Diese Ergebnisse bei Blättern legen zusammengenommen mit den Ergebnissen bei Samen, die von exprimierendem E. coli-AKIII-M4 und E. coli-DHDPS separat in Samen deriviert sind, nahe, dass eine gleichzeitige Expression sowohl von E. coli-AKIII-M4 als auch E. coli-DHDPS in Samen zur erhöhten Akkumulation von freiem Lysin führen würde und aber auch zu einer erhöhten Akkumulation von freiem Threonin führen würde. Tabakpflanzen, die mit einem Vektor transformiert sind, der sowohl E. coli-DHDPS- als auch AKIII-M4-Gene trägt, die mit dem Phaseolin-Promotor verknüpft sind, werden in Beispiel 12 beschrieben. Es gibt eine erhöhte Akkumulation an freiem Lysin und freiem Threonin in diesen Pflanzen. Der erhöhte Wert an freiem Threonin betrug das 4-fache gegenüber normalen Samen anstatt eine 20-fache Erhöhung, die man bei Samen sieht, der AKIII-M4 allein exprimiert. Die Verringerung der Akkumulation an freiem Threonin zeigt, dass Stoffwechselweg-Intermediate den Lysinzweig des biosynthetischen Stoffwechselweges abwärts gelenkt werden. Die erhöhte Menge an freiem Lysin war gegenüber normalem Samen das 2-fache (oder Samen, der E. coli-DHDPS allein exprimiert). Die Zunahme des Lysins in Samen ist jedoch nicht gleichwertig mit der 100-fachen Zunahme, die bei Blättern angetroffen wird.

[0106] Das E. coli-DHDPS-Enzym ist weniger empfindlich gegenüber Lysinhemmung als Pflanzen-DHDPS, wird aber noch immer durch Lysin gehemmt. Die vorstehend ausgeführten Lehren über AK-Proteine zeigten, dass eine Expression eines vollständig Lysin-unempfindlichen Enzyms zu einer sehr viel größeren Akkumulation des Aspartat-Stoffwechselweg-Endproduktes Threonin führen kann als die Expression eines Enzyms, das, obgleich es weniger empfindlich als das Pflanzenenzym ist, noch durch Lysin gehemmt wird. Daher wurden entsprechend der Beschreibung in den Beispielen 15 und 19 Vektoren, die sowohl Corynebakterium-DHDPS- und AKIII-M4-Gene verknüpft mit den samenspezifischen Promotoren konstruiert. In Beispiel 15 werden Tabakpflanzen beschrieben, die mit Vektoren transformiert sind, die sowohl Corynebakterium-DHDPS- als auch AKIII-M4-Gene verknüpft mit den samenspezifischen Promotoren tragen. Wie in Tabelle 9 gezeigt ist, zeigten diese Pflanzen keine größere Akkumulation von freiem Lysin in Samen als zuvor beschriebene Pflanzen, die das E. coli-DHDPS-Enzym gemeinsam mit der Lysin-unempfindlichen AK exprimieren. Im Nachhinein lässt sich dieses Ergebnis durch die Tatsache erklären, dass eine Lysin-Akkumulation in Samen niemals ein ausreichend hohes Niveau erreicht, um E. coli-DHDPS zu hemmen, so dass ein Austausch dieses Enzyms gegen Lysin-unempfindliches Corynebakterium-DHDPS keine Wirkung hat.

[0107] In transformierten Linien, die große Mengen an E. coli-AKIII-M4 und E. coli-DHDPS oder Corynebakterium-DHDPS exprimieren, war es möglich, wesentliche Mengen an α-Aminoadipinsäure nachzuweisen. Von dieser Verbindung wird gelehrt, dass sie ein Intermediat des Stoffwechsels von Lysin in Getreidesamen ist, in Folge ihres geringen Wertes der Akkumulation jedoch normalerweise lediglich über radioaktive Tracer-Experimente detektiert wird. Die Entdeckung hoher Mengen dieses Intermediats, die mit den Mengen an freien Aminosäuren vergleichbar sind, zeigt, dass eine große Menge an Lysin in den Samen dieser transformierten Linien erzeugt wird und in den Stoffwechselweg eintritt. Der Aufbau einer α-Aminoadipinsäure wurde nicht in Transformanten beobachtet, die ausschließlich E. coli-DHDPS oder lediglich AKIII-M4 in Samen exprimieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass es notwendig ist, beide Enzyme gleichzeitig zu exprimieren, um hohe Werte an freiem Lysin in Samen zu erzeugen. Um große Mengen an freiem Lysin zu akkumulieren kann es auch notwendig werden, den Lysin-Stoffwechsel zu verhindern. Alternativ kann es wünschenswert sein, die hohen Mengen an Lysin, das erzeugt wird, in eine Form umzuwandeln, die gegenüber eines Abbaues unempfindlich ist, z. B. durch ihren Einbau in Di-, Tri- oder Oligopeptid oder ein Lysin-reiches Speicherprotein.

ISOLATION EINES PFLANZENLYSIN-KETOGLUTARAT-REDUKTASEGENS

[0108] Es gibt immer noch wenig Information über den Lysin-Stoffwechsel in Pflanzen. Ein Nachweis, der zur Verfügung steht gibt an, dass Lysin auf dem Saccharopin-Weg verstoffwechselt wird. Der erste enzymatische Nachweis für die Existenz dieses Weges war der Nachweis von Lysin-Ketoglutarat-Reduktase (LKR)-Aktivität in unreifem Endosperm von sich entwickelndem Maissamen [Amida et al. (1982) Plant Physiol. 69: 988–989]. LKR katalysiert den ersten Schritt im Lysin-Stoffwechsel, d. h. die Kondensation von L-Lysin mit α-Ketoglutarat zu Saccharopin unter Verwendung von NADPH als einen Co-Faktor. Die LKR-Aktivität nimmt stark von dem

Einsetzen der Endospermentwicklung zu, erreicht einen Höchstwert nach etwa 20 Tagen nach Pollination und nimmt dann ab [Arruda et al. (1983) Phytochemistry 22: 2687–2689]. Um den Katabolismus von Lysin zu vermeiden, wäre es wünschenswert, die LKR-Expression oder -Aktivität zu verringern oder zu eliminieren. Dieses ließe sich durch Klonen des LKR-Gens erreichen, indem ein chimäres Gen zum Exprimieren von Antisense-RNA hergestellt wird (EP-A-84112647.7) für LKR und Einführen des chimären Gens in Pflanzen über eine Transformation.

[0109] Um das Getreide-LKR-Gen zu klonen wurde RNA aus sich entwickelndem Samen 19 Tage nach der Pollination isoliert. Diese RNA wurde zu Clontech Laboratories, Inc., (Palo Alto, CA) für die übliche Synthese einer cDNA-Bank in dem Vektor Lambda Zap II eingeschickt. Die Umwandlung der Lambda Zap II-Bank in eine Phagemidbank und anschließend in eine Plasmidbank wurde unter Einhaltung des Protokolls erreicht, das von Clontech bereitgestellt wird. Sobald sie in eine Plasmidbank umgewandelt sind, führen die erhaltenen Ampicillin-beständigen Klone das cDNA-Insert in den Vektor pBluescript SK(–) ein. Die Expression der cDNA erfolgt unter Kontrolle des lacZ-Promotors auf dem Vektor.

[0110] Zur Auswahl von Klonen, die das LKR-Gen tragen, wurde ein speziell geschaffener E. coli-Wirt, DE126, entsprechend der Beschreibung in Beispiel 20 konstruiert. Der DE126 hat den Genotyp F'16/malE52::Tn10, arg^-, ilvA296, thrA1101, metL100, $lysC^+$, λ^-, rpsL9, malT1, xyl-7, mtl-2, thi-1?, supE44?. Sein Wachstum wird durch 20 µg/ml L-Lysin in einem Synthesemedium gehemmt. Die Expression von LKR in DE126 kehrt erwartungsgemäß die Wachstumshemmung um, indem die Lysinkonzentration herabgesetzt wird. Die Verwendung von DE126 zur Auswahl von Klonen aus der Getreide-cDNA-Bank, die zu einem Lysin-beständigen Wachstum führt, wird in Beispiel 20 beschrieben.

[0111] Die auf diese Weise erhaltene Getreide-LKR-cDNA kann als eine DNA-Hybridisierungssonde zur Identifikation und Isolierung von LKR-Genen aus anderen Pflanzenspezies verwendet werden. Ein chimäres Gen, das zum Exprimieren von Antisense-RNA für LKR geschaffen wird, kann konstruiert werden, indem das LKR-Gen in umgekehrter Orientierung zu einer beliebigen, vorstehend beschriebenen Pflanzen-Promotorsequenz verknüpft wird. Bevorzugte Promotoren wären samenspezifische Promotoren. Bei Getreide wäre ein starker Endosperm-spezifischer Promotor bevorzugt, wie beispielsweise der 10 kD- oder 27 kD-Zein-Promotor.

[0112] Um Pflanzen zu erhalten, die ein chimäres Gen für Antisense-LKR exprimieren, sowie Gene, die Lysin-unempfindliche AK und DHDPS codieren, ließe sich das Antisense-LKR mit Genen verknüpfen, die Lysin-unempfindliche AK und DHDPS codieren und alle drei Gene in die Pflanzen über Transformation einführen. Alternativ könnte das chimäre Gen für Antisense-LKR in zuvor transformierte Pflanzen eingeführt werden, die Lysin-unempfindliche AK und DHDPS exprimieren, oder das Antisense-LKR-Gen könnte in normale Pflanzen eingeführt werden und die Transformanten ließen sich durch Kreuzen mit Pflanzen erhalten, die Lysin-unempfindliche AK und DHDPS exprimieren.

VERWENDUNG DES CTS/LYSC-M4-CHIMÄREN GENS ALS EIN SELEKTIERBARER MARKER FÜR DIE PFLANZENTRANSFORMATION

[0113] Wachstum von Zellkulturen und Sämlingen zahlreicher Pflanzen wird durch hohe Konzentrationen von Lysin-plus-Threonin gehemmt. Das Wachstum wird durch Zusatz von Methionin wiederhergestellt (oder Homoserin, das zu Methionin in vivo umgewandelt wird). Man geht davon aus, dass die Lysin-plus-Threonin-Hemmung aus der Feedback-Hemmung von endogener AK resultiert, die den Fluss durch den Stoffwechselweg reduziert, der zum Aushungern von Methionin führt. Beim Tabak gibt es 2 AK-Enzyme in Blättern, von denen eines Lysin-empfindlich und das andere Threonin-empfindlich ist. [Negrutui et al. (1984) Theor. Appl. Genet. 68: 11–20]. Hohe Konzentrationen von Lysin-plus-Threonin hemmen das Wachstum von Sprösslingen von Tabak-Blattscheiben , wobei die Hemmung durch Zusatz geringer Konzentrationen von Methionin umgekehrt wird. Somit ist die Wachstumshemmung wahrscheinlich auf eine Hemmung der zwei AK-Isozyme zurückzuführen.

[0114] Die Expression von aktivem Lysin und Threonin, die gegenüber AKIII-M4 unempfindlich sind, kehrt auch die Lysin-plus-Threonin-Wachstumshemmung um (Tabelle 2, Beispiel 7). Es besteht eine gute Korrelation zwischen der Menge von AKIII-M4-Protein, das exprimiert wird, und der Resistenz gegenüber Lysin-plus-Threonin. Die Expression von Lysin-empfindlicher Wildtyp-AKIII verfügt über keinen ähnlichen Effekt. Da die Expression des AKIII-M4-Proteins ein Wachstum unter normalen inhibitorischen Bedingungen erlaubt, kann ein chimäres Gen, das eine Expression von AKIII-M4 in Pflanzen hervorruft, als ein selektierbarer genetischer Marker für die Transformation entsprechend der Darstellung in den Beispielen 13 und 17 gewählt werden.

BEISPIELE

[0115] Die vorliegende Erfindung wird in den folgenden Beispielen weiter ausgeführt, worin, sofern nicht anders angegeben, alle Anteile und Prozentanteile auf Gewicht bezogen sind und alle Gradangaben Celsius

sind. Es gilt als selbstverständlich, dass diese Beispiele, obgleich sie bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung zeigen, lediglich als Veranschaulichung dienen. Aus der vorstehend ausgeführten Diskussion und diesen Beispielen ist der Fachmann auf dem Gebiet in der Lage, die wesentlichen Merkmale der vorliegenden Erfindung zu ermitteln und ohne Abweichung vom Erfindungsgedanken und dessen Geltungsbereich zahlreiche Änderungen und Modifikationen an der Erfindung vorzunehmen, um sie den verschiedenen Anwendungen und Bedingungen anzupassen.

BEISPIEL 1

ISOLATION DES E. COLI LYSC-GENS UND MUTATIONEN IN LYSC, DIE ZU LYSIN-UNEMPFINDLICHER AKIII FÜHREN

[0116] Das E. coli lysC-Gen ist bereits geklont, Restriktions-Endonuklease kartiert und sequenziert worden [Cassan et al. (1986) J. Biol. Chem. 261: 1052–1057]. Für die vorliegende Erfindung wurde das lysC-Gen auf einem Bakteriophagen-Lambda-Klon von einer offiziellen Bank von 3.400 überlappenden Segmenten von geklonter E. coli-DNA erhalten, die aufgebaut wurde von Koharar, Akiyama und Isono [Kohara et al. (1987) Cell 50: 595–508]. Diese Bank gewährt eine physikalische Kartierung des gesamten E. coli-Chromosoms und verbindet die physikalische Kartierung mit der genetischen Kartierung. Aus der Kenntnis der Position von lysC in der Kartierung bei 90 Minuten auf der genetische E. coli-Kartierung [Theze et al. (1974) J. Bacteriol. 117: 133–143], der Restriktions-Endonuklease-Kartierung des geklonten Gens [Cassan et al. (1986) J. Biol. Chem. 261: 1052–1057] und der Restriktions-Endonuklease-Kartierung der geklonten DNA-Fragmente in der E. coli-Bank [Kohara et al. (1987) Cell 50: 595–508] war es möglich, die Lambda-Phagen 4E5 und 7A4 [Kohara et al. (1987) Cell 50: 595–508] als wahrscheinliche Kandidaten für den Transport des lysC-Gens zu wählen. Die Phagen wurden in flüssiger Kultur aus einzelnen Plaques entsprechend der Beschreibung [siehe die derzeitigen Protokolle in der Molecular Biology (1987) Ausubel et al., Herausg. John Wiley & Sons, New York] unter Verwendung von LE392 als Wirt aufgezogen [siehe Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press]. Die Phagen-DNA wurde durch Phenolextraktion entsprechend der Beschreibung in den derzeitigen Protokollen [siehe Current Protocols in Molecular Biology (1987) Ausubel et al. eds. John Wiley & Sons New York] hergestellt.

[0117] Aus der Sequenz des Gens wurden mehrere Restriktions-Endonukleasefragmente diagnostisch für das lysC-Gen vorhergesagt, einschließlich ein 1.860 bp EcoR I-Nhe I-Fragment, ein 2.140 bp EcoR I-Xmn I-Fragment und ein 1.600 bp EcoR I-BamH I-Fragment. Jedes dieser Fragmente wurde in den beiden Phagen DNA detektiert und bestätigten, dass diese das lysC-Gen trugen. Das EcoR I-Nhe I-Fragment wurde isoliert und in Plasmid pBR322 subgeklont, das mit den gleichen Enzymen aufgeschlossen wurde und einen Ampicillin-beständigen, Tetracyclin-empfindlichen E. coli-Transformanten ergab. Das Plasmid wurde als pBT436 bezeichnet.

[0118] Um zu bestätigen, dass das geklonte lysC-Gen funktionell einwandfrei war, wurde pBT436 in E. coli-Stamm Gifl06M1 (E. coli Genetic Stock Center strain CGSC-5074) transformiert, das über Mutationen in jedem der drei E. coli AK-Gene verfügt [Theze et al. (1974) J. Bacteriol. 117: 133–143]. Diesem Stamm fehlt die gesamte AK-Aktivität und benötigt daher Diaminopimelat (ein Präkursor des Lysins, der auch für die Zellwand-Biosynthese entscheidend ist), Threonin und Methionin. In dem transformierten Stamm waren alle diese ernährungsbedingten Anforderungen abgelöst, was demonstriert, dass das geklonte lysC-Gen codierte funktionelle AKIII war.

[0119] Die Zugabe von Lysin (oder Diaminopimelat, das leicht in vivo zu Lysin umgewandelt werden kann) bei einer Konzentration von näherungsweise 0,2 mM zu dem Wachstumsmedium hemmte das Wachstum von Gif106M1, das mit pBT436 transformiert war. Verwendet wurde M9-Medium [siehe Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press], ergänzt mit dem Arginin und Isoleucin, die für das Gif106M1-Wachstum benötigt werden, und Ampicillin, um die Selektion für das pBT436-Plasmid zu bewahren. Diese Hemmung wurde durch Zugabe von Threonin-plus-Methionin zu dem Wachstumsmedium umgekehrt. Diese Ergebnisse zeigten, dass AKIII durch exogen zugesetztes Lysin gehemmt werden könnte, das zu einem Aushungern der anderen Aminosäuren führt, die von Aspartat deriviert sind. Diese Eigenschaft des pBT436-transformierten Gif106M1 wurde verwendet, um Mutationen in lysC zu wählen, die Lysin-unempfindliche AKIII codierten.

[0120] Es wurden einzelne Kolonien von Gifl06M1, transformiert mit pBT436, aufgenommen und erneut in 200 µl einer Mischung von 100 µl 1%igem Lysin plus 100 µl M9-Medium erneut suspendiert. Die gesamte Zellsuspension, die 10^7 bis 10^8 Zellen enthielt, wurde auf einer Petri-Schale ausgestrichen, die M9-Medium enthielt, ergänzt mit dem Arginin, Isoleucin und Ampicillin. Auf diese Weise wurden 16 Petri-Schalen vorbereitet. Von den 16 Petri-Schalen erschienen 1 bis 20 Kolonien auf 11. Es wurden eine oder zwei (sofern verfügbar) Kolonien aufgenommen und erneut auf Lysinbeständigkeit getestet und von diesen 9 Lysin-beständige Klone erhalten. Aus 8 von ihnen wurde Plasmid-DNA hergestellt und erneut in Gifl06M1 transformiert, um zu ermit-

teln, ob die Lysin-Beständigkeitsdeterminante plasmidbedingt war. Sechs von den acht Plasmid-DNA's lieferten das Lysin-beständige Kolonien. 3 von diesen 6 trugen lysC-Gene, die AKIII codieren, die durch 15 mM Lysin enthemmt wurden, während Wildtyp-AKIII durch 0,3 bis 0,4 mM Lysin um 50% gehemmt wurde und durch 1 mM Lysin (Einzelheiten siehe beispielsweise 2) > 90% gehemmt wurden.

[0121] Um die molekulare Basis für Lysinbeständigkeit zu ermitteln, wurden die Sequenzen des Wildtyp lysC-Gens und 3 Mutantengene bestimmt. Es wurde die Methode „Verwendung von Mini-Prep-Plasmid-DNA zum Sequenzieren von doppelsträngigen Matrizen mit Sequenase™" angewendet [craft et al. (1988) BioTechniques 6: 544–545]. Zur Erleichterung des Sequenzierens wurden Oligonukleotid-Primer auf der Grundlage der veröffentlichten lysC-Sequenz und näherungsweise alle 200 bp beabstandet synthetisch hergestellt. Die Sequenz des Wildtyp-lysC-Gens, geklont in pBT436 (SEQ ID Nr: 1) differierte von der veröffentlichten lysC-Sequenz in der Kodierungsregion an 5 Positionen. 4 dieser Nukleotiddifferenzen befanden sich an der dritten Position in einem Kodon und würden zu keiner Änderung in der Aminosäuresequenz des AKIII-Proteins führen. Eine der Differenzen würde zu einer Cystein-Glycin-Substitution an der Aminosäure 58 der AKIII führen. Diese Differenzen sind wahrscheinlich auf unterschiedliche Stämme zurückzuführen, von denen die lysC-Gene geklont wurden.

[0122] Die Sequenzen der 3 lysC-Mutantengene, die Lysin-unempfindliche AK codieren, differierten jeweils von der Wildtypsequenz durch ein einziges Nukleotid, was zu einer einzelnen Aminosäuresubstitution in dem Protein führt. Der Mutant M2 hatte ein A substituiert für ein G am Nukleotid 954 der SEQ ID Nr: 1, was zu einer Isoleucin-Methionin-Substitution an der Aminosäure 318 führt, während Mutanten M3 und M4 identische T-C-Substitutionen am Nukleotid 1055 der SEQ ID Nr: 1 hatten, was zu einer Isoleucin-Threonin-Substitution an der Aminosäure 352 führt. Somit sind beide diese einzelnen Aminosäuresubstitutionen ausreichend, um das AKIII-Enzym gegenüber einer Lysinhemmung unempfindlich zu machen.

BEISPIEL 2

HOCHEXPRESSION VON WILDTYP- UND MUTANTEN-LYSC-GENEN IN E. COLI

[0123] Es wurde eine Nco I (CCATGG)-Stelle an dem Translations-Startkodon des lysC-Gens unter Verwendung der folgenden Oligonukleotide eingesetzt:

SEQ ID Nr: 2:

GATCCATGGC TGAAATTGTT GTCTCCAAAT TTGGCG

SEQ ID Nr: 3:

GTACCGCCAA ATTTGGAGAC AACAATTTCA GCCATG

[0124] Beim Wiederverbinden haben diese Oligonukleotide BamH I und Asp718 „klebrige" Enden. Das Plasmid pBT436 wurde mit BamH I aufgeschlossen, das der lysC-Kodierungssequenz vorgelagert schneidet, und als Asp718, das 31 Nukleotide hinter den Startkodon schneidet. Die wiederverbundenen Oligonukleotide wurden an den Plasmidvektor ligiert und E. coli-Transformanten erhalten. Es wurde die Plasmid-DNA hergestellt und für die Insertion der Oligonukleotide auf der Grundlage der Anwesenheit einer Nco I-Stelle gescreent. Ein Plasmid, das die Stelle enthielt, wurde sequenziert, um zu gewährleisten, dass die Insertion korrekt war, und wurde bezeichnet mit pBT457. Zusätzlich zur Erzeugung einer Nco I-Stelle am Startkodon von lysC änderte diese Oligonukleotid-Insertion das zweite Kodon vom TCT, Kodierung auf Serin, zu GCT, Kodierung auf Alanin. Diese Aminosäuresubstitution hatte keinen augenscheinlichen Einfluss auf die AKIII-Enzymaktivität.

[0125] Um die Hochexpression der lysC-Gene in E. coli zu erreichen, wurde der bakterielle Expressionsvektor pBT430 verwendet. Dieser Vektor ist ein Derivat von pE-3a [Rosenberg et al. (1987) Gene 56: 125–135], bei dem das Bakteriophagen T7-RNA-Polymerase/T7-Promotorsystem eingesetzt wird. Das Plasmid pBT430 wurde konstruiert, indem zuerst die EcoR I und Hind III-Stellen in pET-3a an ihren ursprünglichen Positionen zerstört wurden. Ein Oligonukleotid-Adapter, der EcoR I und Hind III-Stellen enthielt, wurde an der BamH I-Stelle von pET-3a insertiert. Dieses erzeugte pET-3aM mit zusätzlich eindeutigen Klonierungsstellen für die Insertion von Genen in den Expressionsvektor. Dann wurde die Nde I-Stelle an der Position des Translationsstartes umgewandelt in eine Nco I-Stelle unter Verwendung der Oligonukleotid-gerichteten Mutagenese. Die DNA-Sequenz von pET-3aM in dieser Region, 5`-CATATGG, wurde zu 5`-CCCATGG in pBT430 umgewandelt.

[0126] Das lysC-Gen wurde vom Plasmid pBT457 als ein 1560 bp Nco I-EcoR I-Fragment ausgeschnitten und in den Expressionsvektor pBT430 insertiert und mit den gleichen Enzymen aufgeschlossen, was den Plasmid pBT461 ergab. Bei der Expression der lysC-Mutantengene (M2, M3 und M4) wurde pBT461 mit Kpn I-EcoR I aufgeschlossen, womit das Wildtyp-lysC-Gen von etwa 30 Nukleotiden hinter dem Translations-Startkodon

entfernt wurde und die analogen Kpn I-EcoR I-Fragmente von den Mutantengenen insertiert wurden, was die Plasmide pBT490, pBT491 bzw. pBT492 ergab.

[0127] Bei der Hochexpressioon wurde jedes der Plasmide in E. coli-Stamm BL21(DE3) umgewandelt [Studier et al. (1986) J. Mol. Biol. 189: 113–130]. Es wurden Kulturen in LB-Medium bei 25°C aufgezogen, das Ampicillin (100 mg/l) enthielt. Bei einer optischen Dichte bei 600 nm von näherungsweise 1 wurde IPTG (Isopropylthio-β-galactosid, der Induktor) bis zu einer Endkonzentration von 0,4 mM eingesetzt und die Inkubation für 3 Stunden bei 25°C fortgesetzt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation aufgenommen und erneut in 1/20tel (oder 1/100tel) des ursprünglichen Kulturvolumens in 50 mM NaCl; 50 mM Tris-Cl, pH 7,5; 1 mM EDTA erneut suspendiert und bei –20°C gefroren. Die gefrorenen Aliquots von 1 ml wurden bei 37°C aufgetaut und in einem Eis-Wasserbad mit Ultraschall behandelt, um die Zellen aufzulösen. Das Lysat wurde bei 4°C für 5 min bei 15.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Pellets erneut in 1 ml des vorgenannten Puffers suspendiert.

[0128] Der Überstand und die Pellet-Fraktionen von nicht induzierten und IPTG-induzierten Kulturen von BL21(DE3)/pBT461 wurden mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Das mit Hilfe der Coomassie-Blaufärbung sichtbar gemachte Hauptprotein in dem Überstand der induzierten Kultur hatte eine relative Molekülmasse von etwa 48 kd, was die erwartete Größe für AKIII war. Etwa 80% des AKIII-Proteins befanden sich im Überstand und AKIII repräsentierte 10 bis 20% des Gesamtproteins von E. coli in dem Extrakt.

[0129] Die AK-Aktivität wurde wie nachfolgend assayiert:

Assay-Mischung (für 12 Assayröhrchen):

4,5 ml H_2O

1,0 ml 8 M KOH

1,0 ml 8 M NH_2OH-HCl

1,0 ml 1 M Tris-HCl pH 8,0

0,5 ml 0,2 M ATP (121 mg/ml in 0,2 M NaOH)

50 µl 1 M $MgSO_4$

[0130] Jedes 1,5 ml Assayröhrchen nach Eppendorf enthielt:

0,64 ml Assay-Mischung

0,04 ml 0,2 M L-Asparaginsäure oder 0,04 ml H_2O

0,0005–0,12 ml Extrakt

H_2O zum Gesamtvolumen 0,8 ml.

[0131] Die Assayröhrchen wurden bei 30°C für die gewünschte Zeitdauer (10 bis 60 min) inkubiert. Danach wurden 0,4 ml $FeCl_3$-Reagenz (10% Gewicht/Volumen $FeCl_3$, 3,3% Trichloressigsäure, 0,7 M HCl) zugesetzt und das Material für 2 min in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Die optische Dichte (OD) wurde bei 540nm abgelesen und mit dem Aspartyl-Hydroxamat-Standard verglichen.

[0132] In der Überstand-Fraktion befanden sich näherungsweise 80% der AKIII-Aktivität. Die spezifische Aktivität von Wildtyp- und Mutanten-Rohextrakten betrug 5 bis 7 Mol-Produkt pro Minute pro Milligramm Gesamtprotein. Die Wildtyp-AKIII war gegenüber der Anwesenheit von L-Lysin in dem Assay empfindlich. Bei einer Konzentration von etwa 0,4 mM wurde eine Hemmung von 50% ermittelt und bei etwa 1,0 mM eine Hemmung von 90%. Im Gegensatz dazu wurden durch 15 mM L-Lysin AKIII-M2, -M3 und -M4 (siehe Beispiel 1) überhaupt nicht gehemmt.

[0133] Das Wildtyp-AKIII-Protein wurde aus dem Überstand der IPTG-induzierten Kultur wie folgt gereinigt. Zu 1 ml Extrakt wurden 0,25 ml 10%iges Streptomycinsulfat zugesetzt und bei 4°C über Nacht gehalten. Die Mischung wurde für 15 min bei 4°C und 15.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde aufgenommen und unter Verwendung einer Sephadex G-25 M-Säule (Column PD-10, Pharmacia) entsalzt. Dann folgte eine Bearbeitung auf einer Mono-Q HPLC-Säule mit einer Eluierung mit 0,1 M NaCl-Gradient. Die zwei 1 ml-Fraktionen, die die größte AKIII-Aktivität enthielten, wurden gepoolt, eingeengt, entsalzt und auf eine HPLC-Sizing-Säule (TSK G3000SW) gegeben. Es wurden Fraktionen in 20 mM KPO_4-Puffer, pH 7,2, 2 mM $MgSO_4$, 10 mM 5-Mercaptoethanol, 0,15 M KCl, 0,5 mM L-Lysin eluiert und mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eine Reinheit von > 95% ermittelt. Das gereinigte AKIII-Protein wurde zur Hazelton Research Facility (310 Swampridge Road, Denver, PA 17517) geschickt, um Kaninchen-Antikörper zu erhalten, die gegen das Protein aufgezogen wurden.

BEISPIEL 3

ISOLATION VON E. COLI- UND CORYNEBAKTERIUM GLUTAMICUM DAPA-GENEN

[0134] Das E. coli dapA-Gen (ecodapA) ist bereits früher geklont, die Restriktions-Endonuklease kartiert und sequenziert worden [Richaud et al. (1986) J. Bakteriol. 166: 297–300]. Für die vorliegende Erfindung wurde das dapA-Gen auf einem Bakteriophagen-Lambda-Klon von einer offiziellen Bank von 3.400 überlappenden

Segmenten von geklonter E. coli-DNA erhalten, die aufgebaut wurde von Kohara, Akiyama und Isono [Kohara et al. (1987) Cell 50: 595–508, siehe Beispiel 1]. Aus der Kenntnis der Kartierungsstelle des dapA bei 53 min auf der genetischen coli-Kartierung [Bachman (1983) Microbiol. Rev. 47: 180–230], der Restriktions-Endonukleasekartierung des geklonten Gens [Richaud et al. (1986) J. Bacteriol. 166: 297–300], und der Restriktions-Endonukleasekartierung der geklonten DNA-Fragmente in der E. coli-Bank [Kohara et al. (1987) Cell 50: 595–508], war es möglich, Lambda-Phagen 4C11 und 5A8 [Kohara et al. (1987) Cell 50: 595–508] als wahrscheinliche Kandidaten für das Tragen des dapA-Gens auszuwählen. Die Phagen wurden in flüssiger Kultur aus einzelnen Plaques aufgezogen, wie beschrieben wurde in [siehe Current Protocols in Molecular Biology (1987) Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons New York] unter Verwendung von LE392 als Wirt [siehe Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press]. Es wurde Phagen-DNA durch Phenolextraktion hergestellt, wie beschrieben wurde in [siehe Current Protocols in Molecular Biology (1987) Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons New York]. Beide Phagen enthielten näherungsweise 2,8 kb Pst I DNA-Fragment, was für das dapA-Gen erwartet wurde [Richaud et al. (1986) J. Bacteriol. 166: 297–300]. Das Fragment wurde aus dem Aufschluss von Phagen 5A8 isoliert und in Pst I aufgeschlossenen Vektor pBR322 insertiert, was Plasmid pBT427 ergab.

[0135] Das Corynebakterium dapA-Gen (cordapA) wurde aus Genom-DNA von ATCC-Stamm 13032 unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) isoliert. Die Nukleotidsequenz des Corynebakterium dapA-Gens ist veröffentlicht worden [Bonnassie et al. (1990) Nucleic Acids Res. 18: 6421]. Aus der Sequenz war es möglich, Oligonukleotid-Primer für PCR zu schaffen, die eine Amplifikation eines DNA-Fragments ermöglichen, welches das Gen enthält, und gleichzeitig wurden an dem Startkodon (Nco I) eindeutige Restriktions-Endonukleasestellen hinzugefügt und unmittelbar hinter dem Stopkodon (EcoR I) des Gens. Die Oligonukleotid-Primere, die verwendet wurden, waren:

SEQ ID Nr: 4:

CCCGGGCCAT GGCTACAGGT TTAACAGCTA AGACCGGAGT AGAGCACT

SEQ ID Nr: 5:

GATATCGAAT TCTCATTATA GAACTCCAGC TTTTTTC

[0136] Es wurde die PCR unter Verwendung eines Perkin-Elmer-Cetus-Satzes entsprechend den Anweisungen des Vertreibers auf einem Thermocycler ausgeführt, hergestellt von dem gleichen Unternehmen. Das Reaktionsprodukt wurde sodann auf Agarosegel gegeben und mit Ethidiumbromid gefärbt und zeigte ein starkes DNA-Band mit der beim Corynebakterium dapA-Gen zu erwartenden Größe von etwa 900 bp. Das PCR-erzeugte Fragment wurde mit Restriktions-Endonuklease Nco I und EcoR I aufgeschlossen und in den Expressionsvektor pBT430 insertiert (siehe Beispiel 2), und aufgeschlossen mit den gleichen Enzymen. Zusätzlich zu der Einführung einer Nco I-Stelle am Translations-Startkodon führten die PCR-Primere auch zu einer Änderung des zweiten Kodons um AGC-codieren auf Serin zu GCT-codieren auf Alanin. Es wurden mehrere Klone isoliert, die aktive, Lysin-unempfindliche DHDPS exprimierten (siehe Beispiel 4), was zeigt dass die zweite Kodon-Aminosäure-Substitution die Aktivität nicht beeinflusste; eines der Klone wurde bezeichnet als FS766.

[0137] Das Nco I- zu EcoR I-Fragment, das das PCR-erzeugte Cornebakterium dapA-Gen trägt, wurde in den Phagemidvektor pGEM-9Zf(–) von Promega subkloniert, einsträngige DNA hergestellt und sequenziert. Diese Sequenz ist in SEQ ID Nr: 6 gezeigt.

[0138] Abgesehen von den Unterschieden in dem zweiten Kodon, wovon bereits die Rede war, passte die veröffentlichte Sequenz mit Ausnahme an zwei Stellen, den Nukleotiden 798 und 799. In der veröffentlichten Sequenz sind dieses TC, während das in SEQ ID Nr: 6 gezeigte Gen die CT sind. Diese Änderung resultiert zu einer Aminosäure-Substitution von Leucin für Serin. Der Grund für diesen Unterschied ist nicht bekannt. Er kann auf einen Fehler in der veröffentlichten Sequenz zurückzuführen sein, auf die Differenz in den Stämmen, die zw Isolierung des Gens verwendet wurden, oder auf einen PCR-erzeugten Fehler. Das letztere scheint unwahrscheinlich, da die gleiche Änderung in mindestens 3 unabhängig isolierten PCR-erzeugten dapA-Genen beobachtet wurde. Die Differenz hatte keinen augenscheinlichen Einfluss auf die DHDPS-Enzymaktivität (siehe Beispiel 4).

BEISPIEL 4

HOCHEXPRESSION DER E. COLI- UND CORYNEBAKTERIUM-GLUTAMINSÄURE-DAPA-GENE IN E. COLI

[0139] Es wurde ein Nco I (CCATGG)-Stelle an dem Translations-Startkodon des E. coli dapA-Gens unter

Verwendung der Oligonukleotid-gerichteten Mutagenese insertiert. Das 2,8 kb Pst I DNA-Fragment, das das dapA-Gen in Plasmid pBT427 (siehe Beispiel 3) trägt, wurde in die Pst I-Stelle von Phagemidvektor pTZ18R (Pharmacia) insertiert und ergab pBT431. Die Orientierung des dapA-Gens war derart, dass der Kodierungsstrang auf der einsträngigen Phagemid-DNA war. Es wurde die Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese unter Verwendung des „Mutagene"-Satzes von Bio-Rad entsprechend den Anweisungen des Herstellers mit dem nachfolgend gezeigten Mutagen-Primer ausgeführt:

SEQ ID Nr: 7:

CTTCCCGTGA CCATGGGCCA TC

[0140] Es wurden mutmaßliche Mutanten auf Anwesenheit einer Nco I-Stelle gescreent, wobei sich von einem Plasmid, das mit pBT437 bezeichnet wurde zeigte, dass es in der Nähe der Mutation durch DNA-Sequenzieren die geeignete Sequenz hatte. Die Hinzufügung einer Nco I-Stelle an dem Translations-Startkodon führte außerdem zu einer Änderung des zweiten Kodons vom TTC-Codieren auf Phenylalanin zu GTC-Codieren auf Valin.

[0141] Um eine Hochexpression der dapA-Gene in L. coli zu erzielen, wurde der bakterielle Expressionsvektor pBT430 (siehe Beispiel 2) verwendet. Das E. coli dapA-Gen wurde aus dem Plasmid pBT437 als ein 1150 bp Nco I-Hind III-Fragment geschnitten und in den Expressionsvektor pBT430 insertiert, aufgeschlossen mit den gleichen Enzymen, was ein Plasmid pBT442 ergab. Zur Expression des Corynebakteriums dapA-Gens wurde 910 bp Nco I- zu EcoR I-Fragment von SEQ ID Nr: 6 insertiert in pBT430 (pFS766, siehe Beispiel 3) verwendet.

[0142] Für die Hochexpression wurde jedes der Plasmide in E. coli-Stamm BL21(DE3) [Studier et al. (1986) J. Mol. Biol 189: 113–130] transformiert. Es wurden Kulturen in LB-Medium bei 25°C aufgezogen, das Ampicillin (100 mg/l) enthielt. Bei einer optischen Dichte bei 600 nm von näherungsweise 1 wurde IPTG (Isopropylthio-β-galactosid, der Induktor) bis zu einer Endkonzentration von 0,4 mM eingesetzt und die Inkubation für 3 Stunden bei 25°C (250 cm) fortgesetzt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation aufgenommen und erneut in 1/20tel (oder 1/100tel) des ursprünglichen Kulturvolumens in 50 mM NaCl; 50 mM Tris-Cl, pH 7,5; 1 mM EDTA erneut suspendiert und bei –20°C gefroren. Die gefrorenen Aliquots von 1 ml wurden bei 37°C aufgetaut und in einem Eis-Wasserbad mit Ultraschall behandelt, um die Zellen aufzulösen. Das Lysat wurde bei 4°C für 5 min bei 15.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Pellets erneut in 1 ml des vorgenannten Puffers suspendiert.

[0143] Der Überstand und die Pellet-Fraktionen von nicht induzierten und IPTG-induzierten Kulturen von BL21(DE3)/pBT442 oder BL21(DE3)/pFS766 wurden mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Das mit Hilfe der Coomassie-Blaufärbung sichtbar gemachte Hauptprotein in dem Überstand und Pellet-Fraktion von beiden induzierten Kulturen hatten eine relative Molekülmasse von etwa 32–34 kd, was die erwartete Größe für DHDPS war. Selbst in den nicht induzierten Kulturen war dieses Protein das auffälligste Protein, das erzeugt wurde.

[0144] In der BL21(DE3)/pBT442 IPTG-induzierten Kultur befanden sich etwa 80% des DHDPS-Proteins im Überstand und DHDPS repräsentierte 10 bis 20% des Gesamtproteins in dem Extrakt. In der BL21(DE3)/pFS766 IPTG-induzierten Kultur befanden sich mehr als 50% des DHDPS-Proteins in der Pellet-Fraktion. Die Pellet-Fraktionen waren in beiden Fällen 90 bis 95% reines DHDPS, ohne dass ein anderes einzelnes Protein in signifikanten Mengen vorhanden war. Damit waren diese Fraktionen zur Verwendung in der Erzeugung von Antikörpern rein genug. Es wurden Pellet-Fraktionen, die 2 bis 4 mg entweder E. coli-DI-IDPS oder Corynebakterium-DHDPS enthielten, in 50 mM NaCl; 50 mM Tris-Cl, pH 7,5; 1 mM EDTA, 0,2 mM Dithiothreit, 0,2% SDS solubilisiert und zu „Hazelton Research Facility" geschickt (310 Swampridge Road, Denver, PA 17517), um gegen die Proteine aufgezogene Kaninchen-Antikörper zu erhalten.

[0145] Die DHDPS-Enzymaktivität wurde wie folgt assayiert:

Assay-Mischung (für 10 × 1,0 ml-Assayröhrchen oder 40 × 0,25 ml für Mikrotiterplatte); unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt:

2,5 ml H_2O

0,5 ml 1,0 M Tris-HCl pH 8,0

0,5 ml 0,1 M Na-Pyruvat

0,5 ml o-Aminobenzaldehyd (10 mg/ml in Ethanol)

25 µl 1,0 M DL-Asparaginsäure-β-semialdehyd (ASA) in 1,0 N HCl

	Assay (1,0ml):	Mikroassay (0,25ml):
DHDPS Assay-Mischung	0,40ml	0,10ml
Enzymextrakt + H2O;	0,10ml	0,025ml
l0mM L-Lysin	5µl oder 20µl	1µl oder 5µl
Inkubation bei 30°C für die gewünschte Zeit. Stop durch Zusatz von:		
l,0N HCl	0,50ml	0,125ml

[0146] Die Farbe ließ eine Entwicklung für 30 bis 60 min zu. Die Ausfällung wurde in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. OD_{540} bei einer Ablesung als Blindprobe bei Null Minuten. Bei Mikroassay, Aliquot 0,2 ml in eine Mikrotiter-Mulde und Ablesung bei OD_{530}.
[0147] Die spezifische Aktivität von L. coli-DHDPS in der Überstand-Fraktion von induzierten Extrakten betrug etwa 50 OD_{540} Einheiten pro Minute pro Milligramm Protein in einem 1,0 ml Assay. Die E. coli-DHDPS war empfindlich gegenüber Vorhandensein von L-Lysin in dem Assay. 50% Hemmung wurden bei einer Konzentration von etwa 0,5 mM ermittelt. Bei Corynebakterium-DHDPS wurde die Aktivität in der Überstand-Fraktion von nicht induzierten Extrakten anstatt in induzierten Extrakten gemessen. Die Enzymaktivität betrug etwa 4 OD_{530}-Einheiten pro Minute pro Milligramm Protein in einem 0,25 ml-Assay. Im Gegensatz zu E. coli-DHDPS war die Corynebakterium-DHDPS durch L-Lysin insgesamt selbst bei einer Konzentration von 70 mM nicht gehemmt.

BEISPIEL 5

EXKRETION VON AMINOSÄUREN DURCH E. COLI MIT HOCHEXPRESSION VON DHDPS UND/ODER AKIII

[0148] Die E. coli-Expressionskassette mit dem E. coli dapA-Gen verknüpft mit dem T7 RNA-Polymerase-Promotor wurde isoliert durch Aufschließen von pBT442 (siehe Beispiel 4) mit Bgl II und BamH I, Abtrennen der Aufschlussprodukte über Agarose-Gelelektrophorese und Eluieren des näherungsweise 1250 bp-Fragmentes aus dem Gel. Dieses Fragment wurde in die BamH I-Stelle von Plasmiden pBT461 (enthält den T7-Promotor/Gen) und pBT492 (enthält den T7-Promotor/lysC-M4-Gen) insertiert. Es wurden Insertionen, wo die Transkription beider Gene in der gleichen Richtung war, durch Restriktions-Endonulease-Analyse identifiziert und ergaben Plasmide pBT517 (T7/dapA + T7/lysC-M4) und pBT519 (T7/dapA + T7/lysC).
[0149] Um E. coli zur Erzeugung und Exkretion von Aminosäuren zu veranlassen, wurden diese Plasmide sowie die Plasmide pBT442, pBT461 und pBT492 (und pBR322 als eine Kontrolle) in E. coli-Stamm BL21(DE3) transformiert [Studier et al. (1986) J. Mol. Biol. 189: 113–130]. Alle diese Plasmide und speziell pBT517 und pBT519 waren in diesem Wirtsstrang etwas unstabil und erforderten eine behutsame Bewahrung der Selektion für Ampicillin-Beständigkeit während des Wachstums.
[0150] Alle Stämme wurden in Minimal-Salz-M9-Medium aufgezogen [siehe Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press], ergänzt mit Ampicillin, um die Selektion für die Plasmide über Nacht bei 37°C zu erhalten. Die Kulturen wurden bei Eneichen eines OD_{600}-Wertes von 1 aufgenommen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation entfernt und die Überstände (3 ml) durch 0,2-Mikrometer-Filter geschickt, um die verbleibenden Zellen und großen Moleküle zu entfernen. Es wurden 5 µl-Aliquots der Überstand-Fraktionen auf Aminosäure-Zusammensetzung mit einem Aminosäure-Analyzer, Beckman Model 6300, unter Verwendung einer Postsäulen-Ninhydrin-Detektion analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 gezeigt.

TABELLE 1
Aminosäurekonzentratio in den Kulturüberständen [mM]

Plasmid	LYS	Thr	Met	Ala	Val	Asp	Glu
pBR322	0	0	0	0,05	0,1	0	0
pBT442	0,48	0	0	0,04	0,06	0	0
pBT461	0,14	0,05	0	0,02	0,03	0	0
pBT492	0,16	0,07	0	0,02	0,03	0	0
pBT517	0,18	0	0,01	0	0	0,02	0,02
pBT519	0,14	0	0,01	0	0	0,01	0

[0151] Alle Plasmide mit Ausnahme der pBR322-Kontrolle führten zu der Exkretion von Lysin in das Kulturmedium. Die Expression des lysC- oder lysC-M4-Gens führte sowohl zur Lysin- als auch zur Threonin-Exkretion. Die Expression von lysC-M4 + dapA führte zur Exkretion von Lysin, Methionin, Asparaginsäure und Glutaminsäure, nicht jedoch zu Threonin. Darüber hinaus wurden in dem Kulturüberstand kein Alanin und kein Valin detektiert. Ähnliche Ergebnisse wurden mit lysC + dapA mit der Ausnahme erhalten, dass keine Exkretion von Glutaminsäure erreicht wurde.

BEISPIEL 6

KONSTRUKTION VON CHIMÄREN DAPA-LYSC UND LYSC-M4-GENEN FÜR EXPRESSION IN PFLANZEN

[0152] Es wurden mehrere Gen-Expressionskassetten zur Konstruktion chimärer Gene für die Expression von ecodapA, cor, lysC und -M4 in Pflanzen verwendet. Die Blatt-Expressionskassette (**Fig.** 1a) ist zusammengesetzt aus dem 35S-Promotor von Blumenkohl-Mosaikvirus [Odell et al.(1985) Nature 313: 810-812; Hull et al. (1987) Virology 86: 482–493], den Translationsleader von dem Chlorophyll-a/b-bindenden Proteingen (Cab) [Dunsmuir (1985) Nucleic Acids Res. 13: 2503–2518] und 3'-Transkriptions-Abbruchregion von der Nopalin-Synthase (Nos)-Gen [Depicker et al. (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1: 561-570]. Zwischen den 5' und 3'-Regionen sind die Restriktions-Endonukleasestellen Nco I (worin das ATG-Translations-Startkodon einbezogen ist), EcoR I, Sma I und Kpn I. Die gesamte Kassette ist von Sal I-Stellen flankiert; es gibt auch eine BamH I-Stelle stromaufwärts der Kassette.
[0153] Eine samenspezifische Expressionskassette (**Fig.** 1b) ist zusammengesetzt aus dem Promotor und dem Transkriptionsabbrecher aus dem Gen, das die (3-Subeinheit des Samen-Speicherproteins, Phaseolin aus der Bohne Phaseolus vulgaris, codiert [Doyle et al. (1986) J. Biol. Chem. 261: 9228–9238]. Die Phaseolinkassette schließt etwa 500 Nukleotide stromaufwärts (5') von dem Translations-Startkodon ein und etwa 1650 Nukleotide stromabwärts (3`) von dem Translations-Stopkodon von Phaseolin. Zwischen den 5`- und 3`-Regionen sind die eindeutigen Restriktions-Endonukleasestellen Nco I (in die das ATG-Translations-Startkodon einbezogen ist), Sma I, Kpn I und Xba I. Die gesamte Kassette ist von Hind III-Stellen flankiert.
[0154] Es wurde eine zweite Samen-Expressionskassette für das cordapA-Gen verwendet. Diese setzte sich zusammen aus dem Promotor und dem Transkriptionsabbrecher von der Sojabohne Kunitz-Trysinhemmer 3 (KT13)-Gen [Jofuku et al. (1989) Plant Cell 1: 427–435]. Die KTI3-Kassette schließt etwa 2000 Nukleotide stromaufwärts (5`) von dem Translations-Startkodon ein und etwa 240 Nukleotide stromabwärts (3`) von dem Translations-Stopkodon von Phaseolin. Zwischen den 5`- und 3`-Regionen sind die eindeutigen Restriktions-Endonukleasestellen Nco I (in die das ATG-Translations-Startkodon einbezogen ist), Xba I, Kpn I und Sma I. Die gesamte Kassette ist von BamH I-Stellen flankiert.
[0155] Es wurde eine konstitutive Expressionskassette für Getreide zur Expression des lysC-M4-Gens und des ecodapA-Gens verwendet. Diese war zusammengesetzt aus einem chimären Promotor, deriviert von Stücken aus 2 Getreidepromotoren und modifiziert durch stellenspezifische in vitro-Mutagenese, um einen hohen Wert eines konstitutiven Promotors und eine 3`-Region von einem Getreidegen unbekannter Funktion zu erhalten. Zwischen den 5`- und 3`-Regionen sind die eindeutigen Restriktions-Endonukleasestellen Nco I (in die das ATG-Translations-Startkodon einbezogen ist), Sma I und Bgl II. Die Nukleotidsequenz der konstitutiven Getreide-Expressionskassette ist in SEQ ID Nr: 16 gezeigt.
[0156] Pflanzen-Aminosäure-biosynthetische Enzyme sind dafür bekannt, dass sie sich in den Chloroplasten befinden und werden daher mit einem Chloroplast-Targetsignal synthetisiert. Bakterielle Proteine, wie beispielsweise DHDPS und AKIII, verfügen über kein derartiges Signal. Es wurde daher eine Chloroplast-Transitsequenz (cts) mit der ecodapA, cor, lysC- und lysC-M4-codierenden Sequenz in einigen chimären Genen

verschmolzen. Die verwendete cts basierte auf der cts der kleinen Untereinheit von Ribulose-l,5-bisphosphat-Carboxylase von Sojabohne [Berry-Lowe et al (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1: 483–498]. Die Oligonukleotide, SEQ ID Nr: 8–11 wurden synthetisiert und entsprechend der nachfolgenden Beschreibung verwendet. Bei Getreide basierte die verwendete cts auf der cts der kleinen Untereinheit von Ribulose-l,5-bisphosphat-Carboxylase von Getreide [Lebrun et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15: 4360] und wird bezeichnet mit mcts, um sie von der Sojabohnen-cts zu unterscheiden. Die Oligonukleotide SEQ ID Nr: 17–22 wurden synthetisiert und entsprechend der nachfolgenden Beschreibung verwendet.

[0157] Es wurden 14 chimäre Gene erzeugt:

Nr. 1) 35S-Promotor/Cab-Leader/lysC/Nos 3'
Nr. 2) 35S-Promotor/Cab-Leader/cts/lysC/Nos 3'
Nr. 3) 35S-Promotor/Cab-Leader/cts/lysC-M4/Nos 3'
Nr. 4) Phaseolin-5'-Region/cts/lysC/Phaseolin-3'-Region
Nr. 5) Phaseolin-5'-Region/cts/lysC-M4/Phaseolin-3'-Region
Nr. 6) 35S-Promotor/Cab-Leader/ecodapA/Nos 3'
Nr. 7) 35S-Promotor/Cab-Leader/cts/ecodA/Nos 3
Nr. 8) Phaseolin-5'-Region/ecodapA/Phaseolin-3'-Region
Nr. 9) Phaseolin-5'-Region/cts/ecodapA/Phaseolin-3'-Region
Nr. 10) 35S-Promotor/Cab-Leader/cts/cordapA/Nos 3
Nr. 11) Phaseolin-5'-Region/cts/cordapA/Phaseolin-3'-Region
Nr. 12) KTI3-5'-Region/cts/cordA/KTI3-3'-Region
Nr. 13) HH534-5'-Region/mcts/lysC-M4/HH2-1-3'-Region
Nr. 14) HH534-5'-Region/mcts/ecodaA/HH2-1-3'-Region

[0158] Das 1440 bp Nco I-Hpa I-Fragment, das die gesamte lysC-codierende Region enthielt, plus etwa 90 bp 3`-nicht codierende Sequenz, wurde aus einem Agarosegel nach einer Elektrophorese isoliert und in eine Blatt-Expressionskassette insertiert, aufgeschlossen mit Nco I und Sma I (chimäres Gen Nr. 1), woraus Plasmid pBT483 erhalten wurde.

[0159] Es wurden die Oligonukleotide SEQ ID Nr: 8 und SEQ ID Nr: 9, die den Carboxy-Endteil des Chloroplast-Targetsignals codieren, wiedervereint, woraus in Nco I-kompatible Enden resultierten, gereinigt über Polyacrylamid-Gelelektrophorese und insertiert in Nco I-aufgeschlossenes pBT461. Die Insertion der korrekten Sequenz in die korrekte Orientierung wurde mit Hilfe der DNA-Sequenzierung überprüft und ergab pBT496. Es wurden die Oligonukleotide SEQ ID Nr: 10 und SEQ ID Nr: 11, die den Amino-Endteil des Chloroplast-Targetsignals codieren, wiedervereint und ergaben Nco I-kompatible Enden, gereinigt über Polyacrylamid-Gelelektrophorese und insertiert in Nco I-aufgeschlossenes pBT496. Die Insertion der korrekten Sequenz in die korrekte Orientierung wurde mit Hilfe der DNA-Sequenzierung nachgewiesen und ergab pBT521. Damit wurde die cts mit dem lysC-Gen verschmolzen.

[0160] Zum Verschmelzen der cts mit dem lysC-M4-Gen wurde pBT521 mit Sal I aufgeschlossen und ein näherungsweise 900 bp-DNA-Fragment, das die cts und die Amino-terminal codierende Region von lysC enthielt, isoliert. Dieses Fragment wurde in Sal I aufgeschlossene pBT492 insertiert, die Amino-terminale Kodierungsreaktion von lysC-M4 mit dem verschmolzenen cts und der Amino-terminalen Kodierungsreaktion fiktiv ersetzt. Da sich die Mutation, die zu einer Lysin-Empfindlichkeit führte, nicht in dem ersetzten Fragment befand, trug das neue Plasmit, pBT523, die an lysC-M4 verschmolzene cts.

[0161] Das 1600 bp Nco I-Hpa-I-Fragment, das das cts enthält, das an lysC plus etwa 90 bp der 3`-nicht codierenden Sequenz verschmolzen ist, wurde isoliert und in die mit Nco I und Sma I (chimäres Gen Nr. 2) aufgeschlossene Blatt-Expressionskassette insertiert, die das Plasmid pBT541 ergibt, und die samenspezifische Expressionskassette mit Nco I und Sma I (chimäres Gen Nr. 4) aufgeschlossen, das das Plasmid pBT543 ergibt.

[0162] In ähnlicher Weise wurde das 1600 bp Nco I-Hpa-I-Fragment, das das cts enthält, das an lysC-M4 plus etwa 90 bp der 3`-nicht codierenden Sequenz verschmolzen ist, wurde isoliert und in die mit Nco I und Sma I (chimäres Gen Nr. 3) aufgeschlossene Blatt-Expressionskassette insertiert, die das Plasmid pBT540 ergibt, und die samenspezifische Expressionskassette mit Nco I und Sma I (chimäres Gen Nr. 5) aufgeschlossen, das das Plasmid pBT544 ergibt.

[0163] Vor der Insertion in die Expressionskassetten wurde das ecodapA-Gen modifiziert, um eine Restriktions-Endonukleasestelle, Kpn I, unmittelbar nach dem Translations-Stopkodon zu insertieren. Für diese Aufgabe wurden die Oligonukleotide SEQ ID Nr: 12–13 synthetisiert:

SEQ ID Nr: 12:

CCGGTTTGCT GTAATAGGTA CCA

SEQ ID Nr: 13:

AGCTTGGTAC CTATTACAGC AAACCGGCAT G

[0164] Die Oligonukleotide SEQ ID Nr: 12 und SEQ ID Nr: 13 wurden wiedervereint, was zu einem Sph Ikompatiblen Ende an dem einen Ende und einem Hind III-kompatiblen Ende an dem anderen führte, und wurde insertiert in Sph I plus Hind III, aufgeschlossen mit pBT437. Die Insertion der korrekten Sequenz wurde mit Hilfe des DNA-Sequenzierens nachgewiesen und ergab pBT443.
[0165] Ein 880 bp Nco I-Kpn-I-Fragment von pBT443, das den gesamten ecodapA-codierenden Bereich enthielt, wurde aus einem Agarosegel nach der Elektrophorese isoliert und in die Blatt-Expressionskassette, aufgeschlossen mit Nco I und Kpn I (chimäres Gen Nr. 6) insertiert, was das Plasmid pBT450 ergab, und in die samenspezifische Expressionskassette, aufgeschlossen mit Nco I und Kpn I (chimäres Gen Nr. 8), was das Plasmid pBT494 lieferte.
[0166] Die Oligonukleotide SEQ ID Nr: 8 und SEQ ID Nr: 9, die den Carboxy-Endteil des Chloroplast-Targetsignals codieren, wurden wiedervereint, was zu kompatiblen Nco I-Enden führte, wurde über Polyacrylamid-Gelelektrophorese gereinigt und insertiert in Nco I aufgeschlossenes pBT450. Die Insertion der korrekten Sequenz in der korrekte Orientierung wurde mit Hilfe des DNA-Sequenzierens nachgewiesen und ergab pBT451. Es wurde ein 950 bp Nco I-Kpn-I-Fragment von pBT451, das den Carboxy-Endteil des Chloroplast-Targetsignals codiert, verschmolzen mit der gesamten ecodapA-Codierungsregion und isoliert aus einem Agarosegel nach einer Elektrophorese und insertiert in die samenspezifische Expressionskassette, aufgeschlossen mit Nco I und Kpn I, was das Plasmid pBT495 ergab. Die Oligonukleotide SEQ ID Nr: 10 und SEQ ID Nr: 11, die den Amino-Endteil des Chloroplast-Targetsignals codieren, wurden wiedervereint, was zu kompatiblen Nco I-Enden führte, wurden über Polyacrylamid-Gelelektrophorese gereinigt und insertiert in Nco I aufgeschlossene pBT451 und pBT495. Die Insertion der korrekten Sequenz in der korrekte Orientierung wurde mit Hilfe des DNA-Sequenzierens nachgewiesen, was pBT455 uns pBT520 ergab. Damit wurde die cts verschmolzen mit dem ecodapA-Gen in der Blatt-Expressionskassette (chimäres Gen Nr. 7) und der samenspezifischen Expressionskassette (chimäres Gen Nr. 9).
[0167] Es wurde ein 870 bp Nco I-EcoR I-Fragment aus pFS766, das die gesamte Getreide-codierende Region enthielt, aus einem Agarosegel nach einer Elektrophorese isoliert und insertiert in die Blatt-Expressionskassette, aufgeschlossen mit Nco I und EcoR I, was das Plasmid pFS789 ergab. Um die cts an dem cordapA-Gen anzubringen, wurde ein DNA-Fragment, das das gesamte cts enthielt, unter Anwendung der PCR hergestellt. Die Matrizen-DNA war pBT540 und die verwendeten Oligonukleotid-Primere waren:

SEQ ID Nr: 14:

GCTTCCTCAA TGATCTCCTC CCCAGCT

SEQ ID Nr: 15:

CATTGTACTC TTCCACCGTT GCTAGCAA

[0168] Die PCR wurde unter Anwendung eines Perkin-Elmer-Cetus-Satzes entsprechend den Anweisungen des Herstellers auf einem Thermocycler, hergestellt von dem gleichen Unternehmen, ausgeführt. Das PCR-erzeugte 160 bp-Fragment wurde mit T4 DNA-Polymerase in Gegenwart der 4 Desoxyribonukleotid-Triphosphate behandelt, um ein Fragment mit glattem Ende zu erhalten. Das cts-Fragment wurde insertiert in pFS789, das mit Nco I aufgeschlossen worden war, und wurde behandelt mit Klenow-Fragment von DNA-Polymerase, um die 5`-Überhänge auszufüllen. Das insertierte Fragment und die Vektor/Insert-Verbindungen wurden ermittelt, um durch DNA-Sequenzieren korrigiert zu werden, was das pFS846 ergab, das das chimäre Gen Nr. 10 enthielt.
[0169] Es wurde das 1030 bp Nco I-Kpn-I-Fragment von pFS846, das die an der Strang-codierenden Region befindliche cts enthielt, aus einem Agarosegel, gefolgt von Elektrophorese, isoliert und insertiert in die Phaseolin-Samenexpressionskassette, aufgeschlossen mit Nco I und Kpn I, was das Plasmid pFS889 ergab, das das chimäre Gen Nr. 11 enthielt. In ähnlicher Weise wurde das 1030 bp Nco I-Kpn-I-Fragment von pFS846 in die KTI3-Samenexpressionskassette insertiert, aufgeschlossen mit Nco I und Kpn I, was das Plasmid pFS862 ergab, das das chimäre Gen Nr. 12 enthielt.
[0170] Die Oligonukleotide SEQ ID Nr: 17 und SEQ ID Nr: l8, die den Carboxy-Endteil des Strang-Chloroplast-Targetsignals codieren, wurden wiedervereint, was zu Xba I- und Nco I-kompatiblen Enden führte, wurden gereinigt über Polyacrylamid-Gelelektrophorese und insertiert in Xba I plus Noc laufgeschlossenes pBT492 (siehe Beispiel 2). Die Insertion der korrekten Sequenz wurde mit Hilfe des DNA-Sequenzierens nachgewiesen und ergab pBT556. Die Oligonukleotide SEQ ID Nr: 19 und SEQ ID Nr: 20, die den mittleren Teil des

Chloroplast-Targetsignals codieren, wurden wiedervereint, was zu den Bgl II- und Xba I-kompatiblen Enden führte, wurden gereinigt über über Polyacrylamid-Gelelektrophorese und insertiert in Bgl II und Xba I-aufgeschlossenes pBT556. Die Insertion der korrekten Sequenz wurde mit Hilfe des DNA-Sequenzierens nachgewiesen und ergab pBT557. Die Oligonukleotide SEQ ID Nr: 21 und SEQ ID Nr: 22, die den Amino-Endteile des Chloroplast-Targetsignals codieren, wurden wiedervereint, ergaben Nco I- und Afl II-kompatible Enden, wurden gereinigt über über Polyacrylamid-Gelelektrophorese und insertiert in Nco I- und Afl II-aufgeschlossenes pBT557. Die Insertion der korrekten Sequenz wurde mit Hilfe des DNA-Sequenzierens nachgewiesen und ergab pBT558. Auf diese Weise wurde mcts mit dem lysC-M4-Gen verschmolzen.

[0171] Es wurde ein 1,6 kb Nco I-Hpa-I-Fragment von pBT558, das die am lysC-M4-Gen angebrachte mcts enthielt, aus einem Agarosegel nach Elektrophorese isoliert und insertiert in die konstitutive Strang-Expressionskassette, aufgeschlossen mit Nco I und Sma I, was das Plasmid pBT573 ergab, das das chimäre Gen Nr. 13 enthielt.

[0172] Um die mcts an dem ecodapA-Gen anzubringen, wurde ein DNA-Fragment, das die gesamte mcts enthielt, unter Anwendung der vorstehend beschriebenen PCR hergestellt. Die Matrizen-DNA war pBT558 und die verwendeten Oligonukleotid-Primere waren:

SEQ ID Nr: 23:

GCGCCCACCG TGATGA

SEQ ID Nr: 24:

CACCGGATTC TTCCGC

[0173] Das mcts-Fragment wurde in pBT450 (vorstehend) insertiert, das mit Nco I aufgeschlossen worden war, und wurde mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase behandelt, um die 5`-Überhänge aufzufüllen. Das insertierte Fragment und die Vektor/Insertions-Verbindungen wurden ermittelt, um durch DNA-Sequenzieren korrigiert zu werden, was das pBT576 ergab. Das Plasmid pBT576 wurde mit Asp718 aufgeschlossen, mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase behandelt, um ein Fragment mit glattem Ende zu ergeben, und sodann mit Nco I aufgeschlossen. Das resultierende 1030 bp Nco I-Fragment mit glattem Ende, das das eco-Gen eingebracht an der mcts enthielt, wurde aus einem Agarosegel nach Elektrophorese isoliert. Dieses Fragment wurde in die konstitutive Expressionskassette insertiert, aufgeschlossen mit Bgl II, behandelt mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase, um ein Fragment mit glattem Ende zu ergeben, und wurde danach aufgeschlossen mit Nco I, um das Plasmid pBT583 zu ergeben, das das chimäre Gen Nr. 14 enthielt.

BEISPIEL 7

TRANSFORMATION VON TABAK MIT DEN 35S-PROMOTOR-LYSC-CHIMÄREN GENEN

[0174] Transformation von Tabak mit den 35S-Promotor/chimären Genen wurde wie folgt ausgeführt:
Es wurden die chimären Gene 35S-Promotor/Cab-Leader/lysC/Nr. 3`, 35S-Promotor/Cab-Leader/cts/lysC/Nr. 3` und 35S-Promotor/Cab-Leader/cts/lysC-M4/Nr. 3` chimären Gene isoliert als 3,5-3,6 kb BamH I-EcoR-I-Fragmente und insertiert in BamH I-EcoR I-aufgeschlossenen Vektor pZS97K (**Fig.** 2), was die Plasmide pBT497, pBT545 und pBT542 ergab. Der Vektor ist Teil eines binären Ti-Plasmid-Vektorsystems [Bevan, (1984) Nucl. Acids. Res. 12: 8711–8720] von Aerobakterium tumefaciens. Der Vektor enthält: (1) das chimäre Gen Nopalin-Synthase-Promotor/Ncomycin-Phosphotransferase-codierende Region (Nr: NPT II) als einen selektierbaren Marker für transformierte Pflanzenzellen [Bevan et al. (1983) Nature 304: 184–186]; (2) die linken und rechten Grenzen der 7-DNA des Ti-Plasmids [Bevan (1984) Nucl. Acids. Res. 12: 8711–8720]; (3) das E. coli lacZ, ein komplementierendes Segment [Vieria und Messing (1982) Gene 19: 259–267] mit eindeutigen Restriktions-Endonukleasestellen für EcoR I, Kpn I, BamH I und Sal I; (4) dem bakteriellen Replikationsursprung aus dem Pseudomonas-Plasmid pVS1 [Itoh et al. (1984) Plasmid 11: 206–220]; und (5) das bakterielle Ncomycin-Phosphotransferase-Gen aus Tn5 [Berg et al. (1975) Proc. Natl. Acad Sci. U.S.A. 72: 3628–3632] als einen selektierbaren Marker für transformiertes A. tumefaciens.

[0175] Die 35S-Promotor/Cab-Leader/cts/lysC/Nr. 3` und 35S-Promotor/Cab-Leader/cts/lysC-M4/Nr. 3`, chimäre Gene, wurden ebenfalls in den binären Vektor pBT456 insertiert, was die pBT547 bzw. pBT546 ergab. Dieser Vektor ist pZS97K, in dem das chimäre Gen 35S-Promotor/Cab-Leader/cts/daA/Nr. 3` zuvor als ein aBamH I-Sal I-Fragment insertiert worden war (siehe Beispiel 9). In dem Prozess des Klonierens traten große Deletionen des dapA-chimären Gens auf. In der Konsequenz waren diese Plasmide gleichwertig den pBT545 und pBT542 insofern, dass lediglich in Pflanzen exprimiertes Transgen (anders als das selektierbare Markergen, NPT II) 35S-Promotor/Cab-Leader/cts/lysC/Nr. 3` oder 35S-Promotor/Cab-Leader/cts/lysC-M4/Nr. 3' war.

[0176] Die binären Vektoren, die die chimären lysC-Gene enthielten, wurden durch triparentale Paarungen transferiert [Ruvkin et al. (1981) Nature 289: 85–88] an Aerobakterium-Stamm LBA4404/pAL4404 [Hockema et al (1983), Nature 303: 179–180]. Die Aerobakterium-Transformanten wurden verwendet, um Tabak-Blattscheiben zu überimpfen [Horsch et al. (1985) Science 227: 1229–1231]. Es wurden transgene Pflanzen regeneriert in selektivem Medium, das Kanamycin enthielt.

[0177] Zur Analyse der Expression der chimären Gene in Blättern der transformierten Pflanzen wurde Protein wie folgt extrahiert. Es wurden näherungsweise 2,5 g junge Pflanzenblätter mit entfernter Mittelrippe in einen Dounce-Homogenisierer mit 0,2g Polyvinylpynolidon und 1 1 ml 50 mM Iris-HCl, pH 8,0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA (TNE) gegeben und gründlich gemahlen. Die Suspension wurde mit einer Behandlung für 20 Sekunden mit einem Brinkman Polyfron-Homogenisierer weiter homogenisiert, der bei der Einstellung 7 betrieben wurde. Die resultierenden Suspensionen wurden bei 16.000 U/min für 20 min bei 4°C in einer Hochleistungszentrifuge nach Dupont-Sorvall unter Verwendung eines SS34-Rotors zur Entfernung von Feststoffen zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Volumen durch Zusatz von TNE nach Erfordernis auf 10 ml eingestellt und 8 ml kaltes, gesättigtes Ammoniumsulfat zugesetzt. Die Mischung wurde für 30 min auf Eis gestellt und entsprechend der vorstehenden Beschreibung zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Pellets, die AKIII-Protein enthielten, erneut in 1 ml TNE suspendiert und durch Passage über eine Sephadex G-25 M-Säule (Column PD-10, Pharmacia) entsalzt.

[0178] Für die immunologische Charakterisierung wurden 3 Volumina des Extraktes mit 1 Volumen 4 × SDS-Gel-Probepuffer (0,17 M Tris-HCl, pH 6,8, 6,7t SDS, 16,7% (3-Mercaptoethanol, 33% Glycerin) extrahiert und 3 AL von jedem Extrakt wurden Streifen auf einen SDS-Polyacrylamidgel gebracht, wobei bakteriell erzeugte AKIII als ein Größenstandard diente, und Protein aus nicht transformierten Tabakblättern extrahiert, das als Negativkontrolle diente. Die Proteine wurden sodann elektrophoretisch auf einer Nitrocellulosemembran (Western Blot) geblottet. Die Membranen wurden an AKIII-Antikörpern exponiert, hergestellt entsprechend der Beschreibuung in Beispiel 2, und zwar bei einer Verdünnung des Kaninchen-Serums von 1 : 5.000 unter Verwendung des von Bio-Rad mit deren Immun-Blot-Kit bereitgestellten Standardprotokoll. Nach dem Spülen zur Entfernung von nicht gebundendem primären Antikörper wurden die Membranen an sekundärem Antikörper exponiert, und zwar Anti-Kaninchen-Ig, konjugiert mit Mehrwertig-Peroxidase (Amersham) bei einer Verdünnung von 1 : 3.000. Nach dem Spülen zur Entfernung von nicht gebundenem sekundären Antikörper wurden die Membranen an einem Amersham-Chemilumineszens-Reagens und einem Röntgenfilm exponiert.

[0179] Sieben von dreizehn Transformanten, die das chimäre Gen 35S-Promotor/Cab-Leader/cts/lysC-M4/Nr. 3` und dreizehn von siebzehn Transformanten, die das chimäre Gen, 35S-Promotor/Cab-Leader/cts/lysC/Nr. 3 ` enthielten, erzeugten AKIII-Protein (Tabelle 2). In allen Fällen hatte das Protein, das mit dem AKIII-Antikörper reagierte, unterschiedliche Größen. Näherungsweise gleiche Mengen von Proteinen, die in der Größe dem in E. coli erzeugten AKIII gleich waren, und ein Protein, das etwa 6 kd größer war, waren in allen Proben auffällig, was nahe legt, dass das Chloroplast-Targetsignal von etwa der Hälfte des synthetisierten Proteins entfernt worden war. Dieses legt weiter nahe, dass etwa die Hälfte des Proteins in das Chloroplast eingetreten war. Darüber hinaus wurde eine erhebliche Menge an Protein mit höherer Molmasse festgestellt. Der Ursprung dieses Proteins ist unklar und die Gesamtmenge, die vorhanden war, war gleich oder etwas größer als die Mengen an ausgereiften und mutmaßlichen AKIII-Präkursorproteinen zusammengenommen.

[0180] Die Blattextrakte wurden auf AK-Aktivität entsprechend der Beschreibung in Beispiel 2 assayiert. Das AKIII ließ sich von der endogenen AK-Aktivität, sofern sie vorhanden war, aufgrund ihres erhöhten Widerstandes gegenüber Lysin-plus-Threonin unterscheiden. Leider war dieser Assay jedoch nicht empfindlich genug, um zuverlässig die AKIII-Aktivität in diesen Extrakten zu detektieren. Null von 4 Transformanten, die das chimäre Gen, 35S-Promotor/Cab-Leader/lysC/Nr. 3` enthielten, zeigten AKIII-Aktivität. Lediglich ein Extrakt aus einem Transformant, der das 35S-Promotor/Cab-Leader/cts/lysC-M4/Nr. 3`-Gen enthielt, erzeugte einen eindeutigen Wert für die Enzymaktivität. Dieses kam vom Transformant 546-49A und war ebenfalls der Extrakt, der den höchsten Wert von AKIII-M4-Protein über einen Western-Blot zeigte.

[0181] Eine alternative Methode, um die Expression von aktivem AKIII-Enzym zu detektieren, bestand in der Auswertung der Empfindlichkeit oder der Beständigkeit von Blattgewebe gegenüber hohen Konzentrationen von Lysin-plus-Threonin. Das Wachstum von Zellkulturen und Sämlingen vieler Pflanzen wird durch hohe Konzentrationen von Lysin-plus-Threonin gehemmt; dieses wird durch Zusatz von Methionin (oder Homoserin, das in vivo zu Methionin umgewandelt wird) umgekehrt. Die Hemmung durch Lysin-plus-Threonin resultiert vermutlich von einer Feedback-Hemmung von endogener AK, die den Fluss durch den Stoffwechselweg reduziert, der zur Aushungerung von Methionin führt. In Tabak gibt es 2 AK-Enzyme in Blättern, von denen eines Lysin-empfindlich ist und eines Threonin-empfindlich ist sensitive [Negrutui et al. (1984) Theor. Appl. Genet. 68: 11–20]. Hohe Konzentrationen an Lysin-plus-Threonin hemmen das Wachstum von Sprösslingen von Tabak-Blattscheiben , wobei die Hemmung durch Zusatz geringer Konzentrationen von Mehtionin umgekehrt wird. Damit ist die Wachstumshemmung wahrscheinlich auf eine Hemmung der 2 AK-Isozyme zurückzuführen.

[0182] Die Expression von gegenüber aktivem Lysin und Threonin unempfindlicher AKIII-M4 ließe sich zw

Umkehr der Wachstumshemmung vorhersagen. Wie aus Tabelle 2 entnommen werden kann, wurde dieses auch beobachtet. Es besteht tatsächlich eine gute Korelation zwischen dem Wert von exprimiertem AKIII-M4-Protein und der Beständigkeit gegenüber Hemmung durch Lysin-plus-Threonin. Die Expression von Lysin-empfindlicher Wildtyp-AKIII hat keine ähnliche Wirkung. Lediglich der am stärksten exprimierende Transformant zeigte eine Beständigkeit auf Lysin-plus-Threonin-Hemmung und diese war sehr viel weniger dramatisch, als sie bei AKIII-M4 beobachtet wurde.

[0183] Zur Messung der freien Aminosäure-Zusammensetzung der Blätter wurden freie Aminosäuren wie folgt extrahiert. Es wurden näherungsweise 30 bis 40 mg Gewebe von jungen Blättern mit einem Rasiermesser zerkleinert und in 0,6 ml Methanol/Chloroform/Wasser gemischt im Verhältnis von 12 vol/5 vol/3 vol (MCW) auf Trockeneis gegeben. Nach 10 bis 30 min wurden die Suspensionen auf Raumtemperatur gebracht und mit einem aufladbaren Hand-Homogenisieren Omni 1000 homogenisiert und danach in einer Eppendorf-Mikrozentrifuge für 3 min zentrifugiert. Es wurden näherungsweise 0,6 ml Überstand dekantiert und weitere 0,2 ml MCW den Pellets zugesetzt, die danach wie vorstehend vortexiert und zentrifugiert wurden. Der zweite Überstand von etwa 0,2 ml wurde dem ersten zugesetzt. Zu diesem wurden 0,2 ml Chloroform gegeben, gefolgt von 0,3 ml Wasser. Die Mischung wurde vortexiert und dann zentrifugiert in einer Eppendorf-Mikrozentrifuge für etwa 3 min, wonach die obere wässrige Phase von näherungsweise 1,0 ml entfernt wurde und in einer Konzentriereinrichtung „Savant Speed Vac" getrocknet. Ein Zehntel der Probe wurde auf einen Aminosäure-Analyzer „Beckman Model 6300" unter Verwendung einer Post-Säulen-Ninhydrin-Detektion gegeben. Die relativen Mengen an freier Aminosäure in den Blättern wurden mit dem Quotienten für Lysin oder Threonin zu Leucin verglichen und Leucin damit als ein interner Standard verwendet. Es gab keinen übereinstimmenden Einfluss der Expression von AKIII oder AKIII-M4 auf die Werte für Lysin oder Threonin (oder irgendeiner anderen Aminosäure) in den Blättern (Tabelle 2).

Tabelle 2
BT542-Transformanten: 35S-Promotor/Cab-Leader/cts/lysC-M4/Nr. 3'
BT545-Transformanten: 35S-Promotor/Cab-Leader/cts/lysC/Nr. 3'
BT546-Transformanten: 35S-Promotor/Cab-Leader/cts/lysC-M4/Nr. 3'
BT547-Transformanten: 35S-Promotor/Cab-Leader/cts/lysC/Nr. 3'

Linie	freie Amino-säuren/Blatt		AKIII Aktivität U/MG/HR	WESTERN BLOT	Beständigkeit Lys 3mM + Thr 3mM
	K/L	T/L			
542-5B	0,5	3,5	0	-	-
542-26A	0,5	3,3	0	-	-
542-27B	0,5	3,4	0	++	-
542-35A	0,5	4,3	0,01	-	-
542-54A	0,5	2,8	0	-	-
542-57B	0,5	3,4	0	-	+
545-5A	n.d.	n.d.	0,02	++	
545-7B	0,5	3,4	0	+	
545-17B	0,6	2,5	0,01	+	
545-27A	0,6	3,5	0	++	
545-50E	0,6	3,6	0,03	++	
545-52A	0,5	3,6	0,02	-	
546-4A	0,4	4,5	0	+	+
546-24B	0,6	4,9	0,04	++	++
546-44A	0,5	6,0	0,03	+	++
546-49A	0,7	7	0,10	+++	+++
546-54A	0,5	6,4	0	+	+
546-56B	0,5	4,4	0,01	-	-
546-58B	0,6	8,0	0	+	++
547-3D	0,4	5,4	0	++	-
547-8B	0,6	5,0	0,02	-	
547-9A	0,5	4,3	0,03	+++	
547-12A	0,7	3,9	0	+++	+
547-15B	0,6	4,5	0	+	-
547-16A	0,5	3,6	0	++	
547-18A	0,5	4,0		+++	-
547-22A	0,8	4,4		-	
547-25C	0,5	4,3		+	
547-28C	0,6	5,6		-	
547-29C	0,5	3,8		+++	+

BEISPIEL 8

TRANSFORMATION VON TABAK MIT DEM PHASEOLIN PROMOTOR/LYSC-CHIMÄREN GENEN

[0184] Die Phaseolin-Promotor/chimären Genkassetten, Phaseolin-5`-Region/cts/lysC/Phaseolin-3`-Region und Phaseolin-5`-Region/cts/lysC-M4/Phaseolin-3`-Region (Beispiel 6) wurden als näherungsweise 3,3 kb Hind III-Fragmente isoliert. Diese Fragmente wurden in die eindeutige Hind III-Stelle des binären Vektors pZS97 (**Fig.** 3) insertiert und ergaben pBT548 und pBT549. Dieser Vektor ist ähnlich dem in Beispiel 7 beschriebenen pZS97K mit der Ausnahme des Vorhandenseins zweier zusätzlicher eindeutiger Klonierungsstellen, Sma I und Hind III, und dem bakteriellen (3-Lactamase-Gen (bewirkt Ampicillinbeständigkeit) als ein selektierbarer Marker für transformiertes A. tumefaciens anstatt des bakteriellen Neomycin-Phosphotransferase-Gens.

[0185] Die Binärvektoren, die die chimären lysC-Gene enthalten, wurden durch triparentale Paarung zum Agrobakterienstamm LBA4404/pAL4404 transferiert, wobei Agrobakterium-Transformanten verwendet wurden, um Tabak-Blattscheiben zu überimpfen und transgene Pflanzen, die mit den in Beispiel 7 ausgeführten Methoden regeneriert wurden.

[0186] Zum Assayieren auf Expression der chimären Gene in Samen der transformierten Pflanzen ließ man die Pflanzen blühen, selbstbestäuben und in Samen schießen. Die Gesamtproteine wurden aus reifem Samen wie folgt extrahiert. Es wurden näherungsweise 30 bis 40 mg Samen in ein 1,5 ml Einweg-Mikrozentrifugenröhrchen aus Kunststoff gegeben und in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2 mM EDTA, 1% SDS, 1% (3-Mercaptoethanol gemahlen. Das Mahlen erfolgte unter Verwendung einer Motormühle mit Einweg-Kunststoffwellen, die so ausgelegt waren, dass sie in das Mikrozentrifugenröhrchen passte. Die resultierenden Suspensionen wurden für 5 min bei Raumtemperatur in einer Mikrozentrifuge zur Entfernung von Feststoff zentrifugiert. Es wurden 3 Volumina Extrakt mit 1 Volumen 4 × SDS-Gel-Probenpuffer (0,17 M, Tris-HCl, pH 6,8, 6,7 t SDS, 16,7% (3-Mercaptoethanol, 33% Glycerin) gemischt und 5FS jedes Extraktes pro Streifen auf einem SDS-Polyacrylamidgel gegeben, wobei die bakteriell erzeugte AKIII als Größenstandard diente, und Protein aus nicht transformiertem Tabaksamen extrahiert, der als Negativkontrolle diente. Die Proteine wurden sodann elektrophoretisch auf einer Nitrocellulosemembran geblottet. Die Membranen wurden an AKIII-Antikörpern (hergestellt entsprechend der Beschreibung in Beispiel 2) bei einer Verdünnung von 1 : 5.000 des Kaninchenserums unter Anwendung des von Bio-Rad mit Immun-Blot-Satz mitgelieferten Standardprotokoll geblottet. Nach dem Spülen zur Entfernung von ungebundenem primären Antikörper wurden die Membranen einem zweiten Antikörper, Esel-Anti-Kaninchen-Ig, konjugiert mit Meenettichperoxidase (Amersham) bei einer Verdünnung von 1 : 3.000 exponiert. Nach dem Spülen zur Entfernung von ungebundenem sekundären Antikörper wurden die Membranen an Amersham-Chemilumineszens-Reagens und Röntgenfilm exponiert.

[0187] Zehn von elf Transformanten, die chimäres Gen, Phaseolin-5`-Region/cts/lysC/Phaseolin-3`-Region, enthielten, und zehn von elf Transformanten, die chimäres Gen, Phaseolin-5`-Region/cts/lysC-M4/Phaseolin-3`-Region enthielten, erzeugten AKIII-Protein (Tabelle 3), In allen Fällen hatte das Protein, das mit dem AKIII-Antikörper reagierte, unterschiedliche Größen. Es wurden näherungsweise gleiche Mengen von Proteinen in gleicher Größe von AKIII in E. coli erzeugt und waren etwa 6 kd größer in allen Proben, was nahelegt, dass das Chloroplast-Targetsignal von etwa der Hälfte des synthetisierten Proteins entfernt worden war. Dieses legt ferner nahe, dass etwa die Hälfte des Proteins in das Chloroplast eingetreten war. Darüber hinaus wurden einige Proteine mit geringerer Molmasse beobachtet, die wahrscheinlich Abbauprodukte des AKIII-Polypeptids darstellen.

[0188] Zur Messung der Zusammensetzung der freien Aminosäure der Samen wurden freie Aminosäuren aus reifen Samen wie folgt extrahiert. Es wurden näherungsweise 30 bis 40 mg Samen und eine näherungsweise gleiche Menge von sterilisiertem Sand in ein 1,5 ml Einweg-Mikrozentrifugenröhrchen aus Kunststoff zusammen mit 0,2 ml Methanol/Chloroform/Wasser gemischt im Verhältnis von 12 vol./ 5 vol./ 3 vol. (MCW) bei Raumtemperatur gegeben. Der Samen wurde unter Verwendung einer Motormühle mit Einwegwellen aus Kunststoff gemahlen, die so bemessen waren, dass sie in das Mikrozentrifugenröhrchen passten. Nach dem Mahlen wurden weitere 0,5 ml MCW zugesetzt, die Mischung vortexiert und danach in einer Eppendorf-Mikrozentrifuge für etwa 3 min zentrifugiert. Es wurden näherungsweise 0,6 ml Überstand dekantiert und weitere 0,2 ml MCW den Pelltes zugegeben, die sodann vortexiert und wie vorstehend zentrifugiert wurden. Der zweite Überstand von etwa 0,2 ml wurde dem ersten zugesetzt. Dazu wurden 0,2 ml Chloroform gegeben, gefolgt von 0,3 ml Wasser. Die Mischung wurde vortexiert und anschließend in einer Eppendorf-Mikrozentrifuge für etwa 3 min zentrifugiert und die obere wässrige Phase von näherungsweise 1,0 ml entfernt und in einer Konzentrationsvorrichtung „Savant Speed Vac" getrocknet. Die Proben wurden in 6 N Salzsäure, 0,4% β-Mercaptoethanol unter Stickstoff für 24 Stunden bei 110° bis 120°C hydrolysiert; ¼ der Probe wurde auf eine Aminosäure-Analyzer Beckman Model 6300 unter Verwendung einer Postsäulen-Ninhydrin-Detektion gegeben. Die relativen Mengen an freier Aminosäure in dem Samen wurden mit den Quotienten von Lysin, Methionin, Threonin oder Isoleucin zu Leucin verglichen, womit Leucin als ein interner Standard verwendet wurde.

[0189] Zur Messung der Zusammensetzung der Gesamt-Aminosäure der Samen wurden 6 Samen in 6 N Salzsäure, 0,4t p-Mercaptoethanol unter Stickstoff für 24 Stunden bei 110° bis 120°C hydrolysiert; 1/10 der Probe wurde auf einen Aminosäure-Analyzer Beckman Model 6300 unter Anwendung der Postsäulen-Ninhydrin-Detektion gegeben. Die relativen Mengen an Aminosäure in den Samen wurden als Quotienten von Lysin, Methionin, Threonin oder Isoleucin zu Leucin verglichen, womit Leucin als ein interner Standard verwendet wurde. Da das Transgen in dieser selbstbestäubten Nachkommenschaft des primären Transformanten segregierte und lediglich 6 Samen analysiert wurden, war zu erwarten, dass es zu einigen Probenahmefehlern kam. Daher wurde die Messung bei einigen Linien mehrfach wiederholt (Tabelle 3).

[0190] Die Expression des cts/lysC-Gens in den Samen führte in einigen Fällen zu einer 2- bis 4-fachen Erhöhung der Menge an freiem Threonin in den Samen und m einer 2- bis 3-fachen Erhöhung der Menge an freiem Lysin. Es hat eine gute Korrelation zwischen Transformanten, die höhere Mengen an AKIII-Protein exprimieren, und solchen mit höheren Mengen an freiem Threonin, was jedoch nicht bei Lysin der Fall war. Diese relativ kleinen Zunahmen an freiem Threonin oder Lysin waren nicht ausreichend, um detektierbare Zunahmen in den Mengen von Gesamt-Threonin oder -Lysin in dem Samen zu liefern. Die Expression des cts/lysC-M4-Gens in den Samen führte in einigen Fällen zu einer 4- bis 23-fachen Erhöhung der Menge an freiem Threonin in den Samen und zu einer 2- bis 3-fachen Erhöhung der Menge an freiem Lysin. Dieses stand in guter Korrelation zwischen den Transformanten, die höhere Mengen an AKIII-Protein exprimieren, und solchen mit höheren Mengen an freiem Threonin, was wiederum jedoch nicht der Fall bei Lysin war. Die größeren Zunahmen an freiem Threonin waren ausreichend, um detektierbare Zunahmen der Mengen an Gesamtthreonin in den Samen zu liefern. 16 bis 25% Zunahmen im Threonin-Gesamtgehalt der Samen wurden in 3 Linien beobachtet, die mehrfach gesamplet wurden. (Die Verhältnisse von Isoleucin zu Leucin sind zum Vergleich dargestellt). Die Linien, die ein erhöhtes Gesamt-Threonin zeigten, waren die gleichen, die die höchsten Werte für die Zunahme an freiem Threonin zeigten und eine hohe Expression des AKIII-M4-Proteins. Aus diesen Ergebnissen ließ sich einschätzen, dass das freie Threonin etwa 1% des in normalen Tabaksamen vorhandenen Gesamt-Threonins darstellt, jedoch etwa 18% des in dem Samen vorhandenen Gesamt-Threonins, die im hohen Maße AKIII-M4 exprimieren.

Tabelle 3
B7548-Transformanten: Phaseolin-5'-Region/cts/lysC/Phaseolin 3'
BT549-Transformanten: Phaseolin-5'-Region/cts/lysC-M4/Phaseolin 3'

	Samen freie Aminosäure			Samen Gesamt-Aminosäure			
Linie	K/L	T/L	I/L	K/L	T/L	I/L	WESTERN
normal	0,49	1,34	0,68	0,35	0,68	0,63	-
548-2A	1,15	2,3	0,78	0,43	0,71	0,67	+
548-4D	0,69	5,3	0,80	0,35	0,69	0,65	+++
548-6A	0,39	3,5	0,85	0,35	0,69	0,64	+
548-7A	0,82	4,2	0,83	0,36	0,68	0,65	++
548-14A	0,41	3,1	0,82	0,32	0,67	0,65	+
548-18A	0,51	1,5	0,69	0,37	0,67	0,63	-
548-22A	1,41	2,9	0,75	0,47	0,74	0,65	+++
548-24A	0,73	3,7	0,81	0,38	0,68	0,65	++
548-41A	0,40	2,8	0,77	0,37	0,68	0,65	+
548-50A	0,46	4,0	0,81	0,33	0,68	0,65	+
548-57A	0,50	3,8	0,80	0,33	0,67	0,65	++
549-5A	0,63	5,9	0,69	0,32	0,65	0,65	+
549-7A	0,51	8,3	0,78	0,33	0,67	0,63	++
549-20A	0,67	30	0,88	0,38*	0,82*	0,65*	++++
549-34A	0,43	1,3	0,69	0,32	0,64	0,63	-
549-39D	0,83	16	0,83	0,35	0,71	0,63	+++
549-40A	0,80	4,9	0,74	0,33	0,63	0,64	+
549-41C	0,99	13	0,80	0,38*	0,79*	0,65*	+++
549-46A	0,48	7,7	0,84	0,34	0,70	0,64	+
549-52A	0,81	9,2	0,80	0,39	0,70	0,65	++
549-57A	0,60	15	0,77	0,35*	0,85*	0,64*	+++
549-60D	0,85	11	0,79	0,37	0,73	0,65	++

„NORMAL“ WURDE ALS DER MITTELWERT VON 6 PROBEN FÜR FREIE AMINOSÄURE UND 23 PROBEN FÜR GESAMT-AMINOSÄUREN BERECHNET.

* GIBT DEN MITTELWERT VON MINDESTENS 5 PROBEN AN.

[0191] Es wurde Samen aus Selbstbestäubung von 2 Pflanzen genommen, die mit dem Phaseolin 5`-Region/cts/lysC-M4/Phaseolin-3`-Region transformiert wurden, Pflanzen 549-5A und 549-40A, die 3 Kanamycin-beständige gegenüber 1 Kanamycin-empfindliche Sämlinge zeigten, kennzeichnend für eine einzelne Stelle der Insertion des Transgens. Es wurden Pflanzen der Nachkommenschaft aufgezogen, selbstbestäubt und Samen auf Segregation des Kanamycin-Marker-Gens analysiert. Die Pflanzen der Nachkommenschaft, die für die Transgen-Insertion homozygot waren, enthielten somit 2 Kopien der Genkassette, akkumuliert näherungsweise 2 Mal so viel wie Threonin in ihren Samen als deren geschwisterliche heterozygote Nachkommenschaft

mit einer Kopie der Genkassette und etwa 8 Mal so viel wie Samen ohne das Gen. Dieses demonstriert, dass der Wert der Expression des Coli-Enzyms die Akkumulation des freien Threonins kontrolliert.

BEISPIEL 9

TRANSFORMATION VON TABAK MIT DEN 35S-PROMOTOR/BCODAPA-CHIMÄREN GENEN

[0192] Die 35S-Promotor/Cab-Leader/ecodap/Nr. 3`- und 35S-Promotor/Cab-Leader/cts/ecodaA/Nr. 3`-chimären Gene wurden als 3.1 und 3.3 kb BamH I-Sal I-Fragmente isoliert und in den BamH I-Sal Iaufgeschlossenen binären Vektor pZS97K (**Fig.** 2) insertiert, was die Plasmide pBT462 bzw. pBT463 ergab. Der binäre Vektor wurde in Beispiel 7 beschrieben.

[0193] Die binären Vektoren, die die chimären ecodapA-Gene enthielten, wurden durch triparentale Paarungen in Agrobakterium-Stamm LBA4404/pAL4404 transferiert, wobei die Agrobakterium-Transformanten verwendet wurden, um Tabak-Blattscheiben zu beimpfen und zu transgenen Pflanzen führten, die mit Hilfe der in Beispiel 7 ausgeführten Methoden regeneriert wurden.

[0194] Zum Assayieren auf Expression der chimären Gene in Blättern der transformierten Pflanzen wurde entsprechend der Beschreibung in Beispiel 7 Protein mit den folgenden Modifikationen extrahiert. Der Überstand der ersten Ammoniumsulfat-Ausfällung von näherungsweise 18 ml wurde mit zusätzlichen 12 ml kaltem, gesättigtem Ammoniumsulfat gemischt. Die Mischung wurde für 30 min auf Eis gesetzt und entsprechend der Beschreibung in Beispiel 7 zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Pellets, die das DHDPS-Protein enthielten, erneut in 1 ml TNE suspendiert und durch Passage über eine Sephadex G-25 M-Säule (Column PD-10, Pharmacia) entsalzt.

[0195] Die Blattextrakte wurden auf DHDPS-Aktivität entsprechend der Beschreibung in Beispiel 4 assayiert. Es konnte E. coli-DHDPS von der Tabak-DHDPS-Aktivität durch seine erhöhte Beständigkeit gegenüber Lysin unterschieden werden; E. coli-DHDPS bewahrte 80 bis 90% seiner Aktivität bei 0,1 mM Lysin, während Tabak-DHDPS bei dieser Konzentration von Lysin vollständig gehemmt war. Einer von 10 Transformanten, die das chimäre Gen enthielten, 35S-Promotor/Cab-Leader/ecodA/Nr. 3`, zeigte E. coli-DHDPS-Expression, während 5 von 10 Transformanten, die das chimäre Gen 35S-Promotor/Cab-Leader/cts/ecodapA/Nr. 3`, enthielten, E. coli-DHDPS-Expression zeigten.

[0196] Es wurden freie Aminosäuren aus Blättern entsprechend der Beschreibung in Beispiel 7 extrahiert. Die Expression des chimären Gens, 35S-Promotor/Cab-Leader/cts/ecodapA/Nr. 3`, nicht jedoch von 35S-Promotor/Cab-Leader/ecodapA/Nr. 3` führte zu wesentlichen Erhöhungen in der Mengen von freiem Lysin in den Blättern. Es wurden Mengen an freiem Lysin von 2- bis 90-fach größer als nicht transformierter Tabak beobachtet.

[0197] Die transformierten Pflanzen ließ man blühen, selbstbestäuben und in Samen schießen. Die Samen von mehreren Linien, transformiert mit 35S-Promotor/Cab-Leader/cts/ecodapA/Nr. 3`-Gen wurden oberflächensterilisiert und auf Agarplatten in Gegenwart von Kanamycin zum Keimen gebracht. Es wurden Linien, die 3 Kanamycin-beständige bis 1-Kanamycin-empfindliche Sämlinge zeigten, die kennzeichnend für eine einzelne Insertionsstelle der Transgene sind, identifiziert. Aus diesen Linien wurde unter Anwendung von genetischen Standardanalysen die Nachkommenschaft erhalten, die für die transgene Insertion homozygot war. Die homozygote Nachkommenschaft wurde sodann aus Expression von E. coli-DHDPS in jungen und reifen Blättern und auf Mengen an freien Aminosäuren charakterisiert, die in jungen und reigen Blättern und in reifen Sämlingen akkumuliert wurden.

[0198] Die Expression von aktivem E. coli-DHDPS-Enzym war eindeutig in jungen und reifen Blättern von homozygoter Nachkommenschaft der Transformanten (Tabelle 4). Große Mengen an freiem Lysin, 50-bis 100-fach mehr als bei normalen Tabakpflanzen, akkumulierten in den jungen Blättern der Pflanzen, jedoch war in den größeren Blättern eine sehr viel geringere Akkumulation von freiem Lysin (2- bis 8-fach) festzustellen. Versuche, mit denen Lysin in dem Phloem gemessen wurde, legen nahe, dass Lysin aus den großen Blättern exportiert wird. Dieses exportierte Lysin kann zur Akkumulation von Lysin in den kleinen wachsenden Blättern beitragen, von denen bekannt ist, dass sie eher Nährstoffe aufnehmen als exportieren. Da die größeren Blätter den größeren Anteil der Biomasse der Pflanzen ausmachen, wird die gesamte erhöhte Akkumulation von Lysin in der Pflanze stärker durch die Menge an Lysin in den größeren Blättern beeinflusst. Es war kein Einfluss auf die Mengen an freiem Lysin in den Samen dieser Pflanzen zu beobachten (Tabelle 4).

TABELLE 4

Nachkommenschaft von BT463-Transformanten, homozygot für 35S-Promoter/Cab-Leader/cts/ecodacA/Nr. 3'

Linie	Blatt-größe	Blatt-freie Aminosäure		E. COLI DHDPS	Samen-freie Aminosäure
		K/L	K/TOT	OD/60'/mq	K/L
normal	3in	0,5	0,006	0	0,5
463-18C-2	3in.	47	0,41	7,6	0,4
463-18C-2	12in.	1	0,02	5,5	---
463-25A-4	3in.	58	0,42	6,6	0,4
463-25A-4	12in.	4	0,02	12,2	---
463-38C-3	3in.	28	0,28	6,1	0,5
463-38C-3	12in.	2	0,04	8,3	---

BEISPIEL 10

TRANSFORMATION VON TABAK MIT DEN PHASEOLIN-PROMOTOR/ECODAPA-CHIMÄREN GENEN

[0199] Die chimären Genkassetten, Phaseolin-5`-Region/ecodA/Phaseolin-3`-Region und Phaseolin-5`-Region/cts/ecodapA/Phaseolin-3`-Region (Beispiel 6) wurden als näherungsweise 2.6 bzw. 2.8 kb Hind III-Fragmente isoliert. Diese Fragmente wurden in die eindeutige Hind III-Stelle des binären Vektors pZS97 (**Fig.** 3) eingesetzt und ergaben pBT506 bzw, pBT534. Dieser Vektor wurde in Beispiel 8 beschrieben.

[0200] Die binären Vektoren, die chimäre ecodapA-Gene enthalten, wurden durch triparenterale Paarungen auf Agrobakterium-Stamm LBA4404/pAL4404 transferiert, wobei Agrobakterium Transformanten zw Beimpfung der Tabak-Blattscheiben verwendet wurden, wobei die resultierenden transgenen Pflanzen nach den in Beispiel 7 ausgeführten Methoden regeneriert wurden.

[0201] Um auf Expression der chimären Gene zu assayieren, ließ man transformierte Pflanzen blühen, selbstbestäuben und in Samen schießen. Die gesamten Samenproteine wurden entsprechend der Beschreibung in Beispiel 8 extrahiert und entsprechend der Beschreibung in Beispiel 7 immunologisch analysiert mit der folgenden Modifikation. Die Western-Blot-Membranen wurden an DHDPS-Antikörpern exponiert, hergestellt in Beispiel 4 mit einer Verdünnung von 1 : 5.000 des Kaninchen-Serums unter Anwendung des von Bio-Rad mit deren Immun-Blot-Kit mitgelieferten Standardprotokolls.

[0202] Dreizehn von vierzehn Transformanten, die das chimäre Gen, Phaseolin-5`-Region/ecodapA/Phaseolin-3 `-Region, enthielten, und neun von dreizehn Transformanten, die das chimäre Gen, Phaseolin-5`-Region/cts/ecodapA/Phaseolin-3`-Region enthielten, erzeugten mit Hilfe des Western-Blottings (Tabelle 3) detektierbares DHDPS-Protein. Das Protein, das mit dem DHDPS-Antikörper reagierte, hatte mehrere Größen. Der größte Teil des Proteins war gleich groß wie das DHDPS, das in E. coli erzeugt wurde und zwar unabhängig davon ob das chimäre Gen in die Chloroplast-Transitsequenz einbezogen war oder nicht. Dieses zeigt, dass das Chloroplast-Targetsignal wirksam aus dem synthetisierten Präkursorprotein entfernt worden war. Dieses legt weiter nahe, dass der größte Teil des Proteins in den Chloroplast eingetreten war. In einigen Fällen wurden einige Proteine geringerer Molmasse beobachtet, die wahrscheinlich Abbauprodukte des DHDPS-Polypeptids darstellen.

[0203] Um die Zusammensetzung der freien Aminosäure und die Zusammensetzung der Gesamt-Aminosäure der Samen zu messen, wurden freie Aminosäuren und Gesamt-Aminosäuren aus reifen Samen extrahiert und entsprechend der Beschreibung in Beispiel 8 analysiert. Die Expression entweder des eco-Gens oder von cts/ecodapA hatte keinen Einfluss aus das Gesamtlysin oder die Threonin-Zusammensetzung der Samen in irgendeiner der transformierten Linien (Tabelle 5). Mehrere der Linien, die mit dem Phaseolin-5`-Region/cts/ecodapA/Phaseolin-3`-chimären Gen transformiert worden waren, wurden auch auf einen etwaigen Einfluss auf die Zusammensetzung der freien Aminosäure getestet. Wiederum wurde auch kein mäßiger Einfluss auf die Lysin- oder Threonin-Zusammensetzung der Samen in Linien beobachtet, die hohe Mengen an E. coli-DHDPS-Protein exprimieren (Tabelle 5). Dieses war ein überraschendes Ergebnis unter Annahme des dramatischen Einflusses (wie er in Beispiel 9 beschrieben wurde), den die Expression dieses Proteins auf die Mengen an freiem Lysin in Blätter hat.

[0204] Eine mögliche Erklärung dafür besteht darin, dass das mit Hilfe des Western Blot beobachtete

DHDPS-Protein nicht funktionell war. Um diese Hypothese zu testen, wurden Proteinextrakte aus reifen Samen hergestellt und auf DHDPS-Aktivität assayiert. Es wurden näherungsweise 30 bis 40 mg Samen in ein 1,5 ml Einweg-Mikrozentrifugenröhrchen aus Kunststoff gegeben und in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 50 mM Nail, 1 mM EDTA (TNE) gemahlen. Das Mahlen erfolgte unter Verwendung einer Motormühle mit Einwegwellen aus Kunststoff, die so bemessen waren, dass sie in das Mikrozentrifugenröhrchen passten. Die resultierenden Suspensionen wurden für 5 min bei Raumtemperatur in einer Mikrozentrifuge zur Entfernung der Feststoffe zentrifugiert. Es wurden näherungsweise 0,1 ml wässriger Überstand zwischen dem pelletisierten Material und der oberen Ölphase entfernt. Die Samenextrakte wurden auf DHDPS-Aktivität entsprechend der Beschreibung in Beispiel 4 assayiert. Es konnte E. coli-DHDPS von der Tabak-DHDPS-Aktivität durch ihre erhöhte Beständigkeit gegenüber Lysin unterschieden werden; E. coli-DHDPS bewahrte etwa 50% seiner Aktivität bei 0,4 mM Lysin, während Tabak-DHDPS vollständig bei dieser Konzentration von Lysin vollständig gehemmt war. In allen 4 getesteten Samenextrakten wurden hohe Werte der E. coli-DHDPS-Aktivität angetroffen, womit diese Erklärung ausscheidet.

[0205] Das Vorhandensein der cts-Sequenz in dem chimären ecodapA-Gen war für die Auslösung der Akkumulation hoher Mengen an Lysin in Blättern entscheidend. So war eine andere mögliche Erklärung, dass die cts-Sequenz während der Insertion des chimären Phaseolin-5`-Region/cts/ecodapA/Phaseolin-3`-Gens in dem binären Vektor zum gewissen Anteil verlorengegangen war. Die PCR-Analyse mehrerer transformierter Linien demonstrierte die Anwesenheit der cts-Sequenz, womit jedoch diese Möglichkeit ausgeschlossen ist.

[0206] Eine dritte Erklärung war die, dass Aminosäuren normalerweise in Samen nicht synthetisiert werden und daher die anderen Enzyme in dem Stoffwechselweg in den Samen nicht vorhanden sind. Die Ergebnisse der Versuche sind in Beispiel 8 dargestellt, worin die Expression von Phaseolin-5`-Region/cts/lysC-M4/Phaseolin-3`-Gen zu einer Akkumulation hoher Mengen von freiem Threonin in Samen resultierte, was darauf hinweist, das dies nicht der Fall ist.

[0207] Wenn man diese Ergebnisse und die in Beispiel 9 präsentierten Ergebnisse zusammenfasst, demonstrieren diese, dass die Expression von Lysin-unempfindlichem DHDPS entweder in Samen oder Blättern nicht ausreichend ist, um eine Akkumulation von erhöhtem freien Lysin in Samen zu erzielen.

TABELLE 5
BT506-Transformanten: Phaseolin-5'-Region/ecodA/Phaseolin-3'
BT534-Transformanten: Phaseolin-5'-Region/cts/ecodaA/Phaseolin-3`

Linie	Samen: freie Aminosäuren	Samen: Gesamt-Aminosäuren	E. COLI DHDPS	WESTERN

	K/L		K/L	T/L	0D/60'/MG	
normal	0,49	1,34	0,35	0,68		
506-2B			0,34	0,66		+
506-4B			0,33	0,67		+
506-16A			0,34	0,67		+
506-17A			0,36	0,55	7,7	
506-19A			0,37	0,45		++
506-22A			0,34	0,67		++
506-23B			0,35	0,67		++
506-33B			0,34	0,67		++
506-38B			0,36	0,69	8,7	
506-39A			0,37	0,70		++
506-40A			0,36	0,68		-
506-47A			0,32	0,68		+++
506-48A			0,33	0,69		+++
506-49A			0,33	0,69		+++
534-8A			0,34	0,66		-
534-9A			0,36	0,67		++
534-22B	0,43	1,32	0,39	0,51	4,9	+++
534-31A			0,34	0,66		-
534-38A	0,35	1,49	0,42	0,33		+++
534-39A			0,38	0,69		+
534-7A			0,34	0,67		+++
534-25B			0,35	0,67		+++
534-34B	0,80	1,13	0,42	0,70		-
534-35A	0,43	1,18	0,33	0,67		+++
534-37B	0,42	1,58	0,37	0,68		-
534-43A			0,35	0,68		+++
534-48A	0,46	1,24	0,35	0,68	6,2	+++

BEISPIEL 11

TRANSFORMATION VON TABAK MIT DEN 35S-PROMOTOR/CTS/DAPA-PLUS-35S-PROMOTOR/CTS/LYSC-M4-CHIMÄREN GENEN

[0208] Die 35S-Promotor-Cab-Leader/cts/ecodA/Nr. 3`- und 35S-Promotor-Cab-Leader/cts/lysC-M4/Nr. 3`-chimären Gene wurden in dem binären Vektor pZS97K (**Fig.** 2) kombiniert. Der binäre Vektor wurde in Beispiel 7 beschrieben. Es wurde ein Oligonukleotid-Adapter synthetisiert, um die BamH I-Stelle an dem 5`-Ende des 35S-Promotor/Cab-Leader/cts/lysC-M4/Nr. 3`-chimären Gens (siehe **Fig.** 1) in eine EcoR I-Stelle umzuwandeln. Sodann wurde das 35S-Promotor/Cab-Leader/cts/lysC-M4/Nr. 3`-chimäre Gen als ein 3.6 kb EcoR I-Fragment aus dem Plasmid pBT540 (Beispiel 6) isoliert und insertiert in pBT463 (Beispiel 9), aufgeschlossen mit EcoR I, was ein Plasmid pBT564 ergab. Dieser Vektor hatte sowohl das 35S-Promotor/Cab-Lea-

der/cts/ecodagA/Nr. 3`- als auch das 35S-Promotor/Cab-Leader/cts/lysC-M4/Nr. 3`chimäre Gen in der gleichen Orientierung insertiert.

[0209] Der binäre Vektor, der die chimären ecodapA- und lysC-M4-Gene enthielt, wurde durch triparentale Paarungen zu Aerobakterien-Stamm LBA4404/pAL4404 transferiert, wobei die Agrobakterium-Transformanten zur Beimpfung von Tabak-Blattscheiben verwendet wurden und die resultierenden transgenen Pflanzen mit Hilfe der in Beispiel 7 ausgeführten Methoden regeneriert wurden.

[0210] Um die Expression der chimären Gene in Blättern der transformierten Pflanzen zu assayieren, wurde entsprechend der Beschreibung in Beispiel 7 für AKIII und entsprechend der Beschreibung in Beispiel 9 für DHDPS Protein extrahiert. Die Blattextrakte wurden auf DHDPS-Aktivität entsprechend der Beschreibung in den Beispielen 4 und 9 assayiert. E. coli-DHDPS konnte von der Tabak-DHDPS-Aktivität aufgrund ihrer Beständigkeit gegenüber Lysin unterschieden werden; E. coli-DHDPS bewahrte 80 bis 90% ihrer Aktivität bei 0,1 mM Lysin, während Tabak-DHDPS bei dieser Konzentration an Lysin vollständig gehemmt war. Die Extrakte wurden immunologisch auf Expression von AKIII- und DHDPS-Proteinen über Western-Blots entsprechend der Beschreibung in den Beispielen 7 und 10 charakterisiert.

[0211] Zehn von zwölf Transformanten exprimierten E. coli-DHDPS-Enzymaktivität (Tabelle 6). Es bestand eine gute Korrelation zwischen dem Wert der Enzymaktivität und der Menge an immunologisch detektiertem DHDPS-Protein. Entsprechend der Beschreibung in Beispiel 7 war das AK-Assay nicht empfindlich genug, um diesen Extrakten Enzymaktivität zu detektieren. Allerdings wurde AKIII-M4-Protein immunologisch in acht von zwölf Extrakten detektiert. In einigen Transformanten, 564-21A und 47A, gab es eine große Ungleichheit zwischen dem Wert der Expression von DHDPS und AKIII-M4, wobei jedoch zehn von zwölf Linien in guter Korrelation standen.

[0212] Es wurden freie Aminosäuren aus Blättern extrahiert und auf die Aminosäure-Zusammensetzung entsprechend der Beschreibung in Beispiel 7 analysiert. Bei Abwesenheit von signifikantem AKIII-M4 bestimmte der Wert der Expression des chimären Gens, 35S-Promotor/Cab-Leader/cts/ecodA/Nr. 3`, den Wert der Lysin-Akkumulation (Tabelle 6). Vergleicht man die Linien 564-21A, 47A und 39C, so exprimiert keine von ihnen signifikant AKIII-M4. Die Linie 564-21A akkumuliert etwa 10-fach höhere Mengen an Lysin als Linie 564-47A, die weniger E. coli-DHDPS exprimiert und 40-fach höhere Mengen an Lysin als 564-39C, die keine E. coli-DI-IDPS exprimiert. Allerdings kontrolliert in den Transformanten, die alle ähnliche Mengen an E. coli-DI-IDPS (564-18A, 56A, 36E, 55B, 47A) exprimieren, der Wert der Expression des chimären Gens, 35S-Promotor/Cab-Leader/cts/lysC-M4/Nr. 3`, die Menge der Akkumulation von Lysin. Damit ist klar, dass, obgleich die Expression von 35S-Promotor/Cab-Leader/cts/lysC-M4/Nr. 3` keinen Einfluss auf die Mengen an freier Aminosäure von Blättern hatte, sofern die Expression allein erfolgte (siehe Beispiel 7), sie die Lysin-Akkumulation erhöhen kann, wenn sie zusammen mit dem 35S-Promotor/Cab-Leader/cts/ecodapA/Nr. 3`-chimären Gen exprimiert wird. Die gemeinsame Expression dieser Gene beeinflusste nicht die Menge irgendeiner anderen freien Aminosäure in den Blättern.

TABELLE 6
BT564-Transformanten: 35S-Promoter/Cab-Leader/cts/ecodA/Nr. 3'
35S-Promoter/Cab-Leader/cts/lysC-M4/Nr. 3'

Linie	freie AA nmol/4mg	Blatt	freie AA	Baltt	E. COLI DHDPS U/MG/HR	WESTERN DHDPS	WESTERN AK-III
	TOT	K	K/L	K/TOT			
564-21A	117	57	52	0,49	2,4	+++	+/-
564-18A	99	56	69	0,57	1,1	++	++
564-56A	104	58	58	0,56	1,5	++	++
564-36E	85	17	17	0,20	1,5	++	+++
564-55B	54	5	9,1	0,10	1,0	++	+
564-47A	18	1	4,8	0,06	0,8	++	-
564-35A	37	7	13	0,18	0,3	+	++
564-60D	61	3	4,5	0,06	0,2	+	++
564-45A	46	4	8,1	0,09	0,4	+	+
564-44B	50	1	1,7	0,02	0,1	+/-	-
564-49A	53	1	1,0	0,02	0	+/-	-
564-39C	62	1	1,4	0,02	0	-	-

[0213] Es wurden freie Aminosäuren aus reifen Samen extrahiert, die von selbstbestäubten Pflanzen hergeleitet waren, und entsprechend der Beschreibung in Beispiel 8 quantitativ bestimmt. Es gab keinen signifikanten Unterschied im Gehalt an freier Aminosäure von Samen aus nicht transformierten Pflanzen im Vergleich zu denen von Pflanzen, die in Blättern die höchste Akkumulation von freiem Lysin zeigten, d. h. die Pflanzen 564-18A, 564-21A, 564-36E, 564-56A.

BEISPIEL 12

TRANSFORMATION VON TABAK MIT DEN PHASEOLIN-PROMOTOR/CTS/ECODAPA-PLUS-PHASEOLIN-PROMOTOR/CTS/LYSC-M4-CHIMÄREN GENEN

[0214] Die chimären Genkassetten, Phaseolin-5`-Region/cts/ecodap/Phaseolin-3`-Region und Phaseolin-5`-Region/cts/lysC-M4/Phaseolin-3` (Beispiel 6) wurden in dem binären Vektor pZS97 (**Fig.** 3) vereint. Der binäre Vektor wurde in Beispiel 8 beschrieben. Um dieses zu erreichen, wurde das Phaseolin-5`-Region/cts/ecodapA/Phaseolin-3'-chimäre Gen als ein 2.7 kb Hind III-Fragment isoliert und insertiert in die Hind III-Stelle von Vektor pUC1318 [Kay et al(1987) Nucleic Acids Res. 6: 2778], was zu pBT568 führte. Dann war es möglich, pBT568 mit BamH I aufzuschließen und das chimäre Gen auf einem 2.7 kb BamH I-Fragment zu isolieren. Dieses Fragment wurde insertiert in BamH I-aufgeschlossenes pBT549 (Beispiel 8), was pBT570 ergab. Der binäre Vektor verfügte über beide chimäre Gene, Phaseolin-5`-Region/cts/ecodap/Phaseolin-3`-Gen und Phaseolin-5`-Region/cts/lysC-M4/Phaseolin-3 , insertiert in der gleichen Orientierung.
[0215] Der binäre Vektor pBT570 wurde durch triparentale Paarung zu Aerobakterium-Stamm LBA4404/pAL4404 transferiert, die Aerobakterium-Transformanten zw Beimpfung von Tabak-Blattscheiben verwendet und die resultierenden transgenen Pflanzen mit Hilfe der in Beispiel 7 ausgeführten Methoden regeneriert.
[0216] Um auf Expression der chimären Gene in den Samen der transformierten Pflanzen Zu assayieren, ließ man die Pflanzen blühen, selbstbestäuben und in Samen schießen. Die Gesamtproteine wurden aus reifen Samen extrahiert und mit Hilfe von Western-Blots entsprechend der Beschreibung in Beispiel 8 analysiert.
[0217] Einundzwanzig von fünfundzwanzig Transformanten exprimierten das DHDPS-Protein und neunzehn von ihnen exprimierten auch das AKIII-Protein (Tabelle 7). Die Mengen der exprimierten Proteine wurden in Beziehung gesetzt zur Zahl der Genkopien, die in den Transformanten vorhanden waren; diese am höchsten exprimierenden Linien, 570-4B, 570-12C, 570-59B und 570-23B, hatten zwei oder mehrere Stellen der Inser-

tion der Genkassette auf der Grundlage der Segregation des Kanamycin-Markergens. Es wurde enzymatisch aktive E. coli-DHDPS in reifen Samen aller getesteten Linien festgestellt, in denen Protein detektiert war.

[0218] Um die Aminosäure-Zusammensetzung der Samen zu messen, wurden freie Aminosäuren aus reifen Samen extrahiert und entsprechend der Beschreibung in Beispiel 8 analysiert. Es bestand eine gute Korrelation zwischen Transformanten, die größere Mengen sowohl an DHDPS- als auch AKIII-Protein exprimierten, und solchen mit höheren Mengen an freiem Lysin und Threonin. Die am höchsten exprimierenden Linien (gekennzeichnet in Tabelle 7 mit einem Sternchen) zeigten bis zu einer 2-fachen Zunahme an freien Lysinmengen und bis zu einer 4-fachen Zunahme der Menge an freiem Threonin in den Samen.

[0219] In den am stärksten exprimierenden Linien war es möglich, eine große Menge an α-Aminoadipinsäure zu detektieren. Diese Verbindung ist dafür bekannt, dass sie ein Intermediat in dem Stoffwechsel von Lysin in Getreidesamen ist, die normalerweise aber lediglich auf dem Wege radioaktiver Tracer-Experimente detektiert wird, was auf ihr geringes Maß der Akkumulation zurückzuführen ist. Der Aufbau hoher Mengen an diesem Intermediat zeigt, dass eine große Menge an Lysin in den Samen dieser transformierten Linien erzeugt worden ist und den Stoffwechselweg passiert. Der Aufbau einer α-Aminoadipinsäure wurde nicht in Transformanten von Samen beobachtet, die ausschließlich E. coli-DHDPS oder ausschließlich AKIII-M4 exprimieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass es notwendig ist, beide Enzyme gleichzeitig zu exprimieren, um hohe Mengen an freiem Lysin zu erzeugen.

TABELLE 7

BT570-Transformanten: Phaseolin-5'-Region/cts/lysC-M4/Phaseolin-3'-Region Phaseolin-5'-Region/cts/ecodA/Phaseolin-3'-Region

	freie Aminosäuren/Samen		Gesamt-Aminosäuren/Samen		WESTERN E. COLI	WESTERN E. COLI	E. COLI DHDPS	Nach-kommen-schaft
Linie	K/L	T/L	K/L	T/L	DHDPS	AKIII	U/MG/HR	Kan^r:Kan^s

NORMAL	0,49	1,3	0,35	0,68	-	-		
570-4B	0,31	2,6	0,34	0,64	+++	++		15:1
570-7C	0,39	2,3	0,34	0,64	++	+		
570-8B	0,29	2,1	0,34	0,63	+	-		
570-12C*	0,64	5,1	0,36	0,68	++++	++++	> 4,3	> 15:1
570-18A	0,33	3,0	0,35	0,65	++	++		15:1
570-24A	0,33	2,0	0,34	0,65	++	-		
570-37A	0,33	2,1	0,34	0,64	+/-	+/-		
570-44A	0,29	2,1	0,34	0,64	++	+		
570-46B	0,41	2,1	0,35	0,65	++	+		
570-51B	0,33	1,5	0,33	0,64	-	-	0	
570-59B*	0,46	3,0	0,35	0,65	+++	+++	2,6	> 15:1
570-80A	0,31	2,2	0,34	0,64	++	+		
570-11A	0,28	2,3	0,34	0,67	++	++		3:1
570-17B	0,27	1,6	0,34	0,65	-	-		
570-20A	0,41	2,3	0,35	0,67	++	+		
570-21B	0,26	2,4	0,34	0,68	++	+		
570-23B*	0,40	3,6	0,34	0,68	+++	+++	3,1	63:1
570-25D	0,30	2,3	0,35	0,66	++	+/-		
570-26A	0,28	1,5	0,34	0,64	-	-		
570-32A	0,25	2,5	0,34	0,67	++	+		
570-35A	0,25	2,5	0,34	0,63	++	++		3:1
570-38A-1	0,25	2,6	0,34	0,64	++	++		3:1
570-38A-3	0,33	1,6	0,35	0,63	-	-		
570-42A	0,27	2,5	0,34	0,62	++	++		3:1
570-45A	0,60	3,4	0,39	0,64	++	++		3:1

* freie Aminosäure-Probe mit α-Aminoadipinsäure

BEISPIEL 13

VERWENDUNG DES CTS/LYSC-M4-CHIMÄREN GENS ALS EIN SELEKTIERBARER MARKER FÜR TABAK-TRANSFORMATION

[0220] Das 35S-Promotor/Cab-Leader/cts/lysC-M4/Nr. 3`-chimäre Gen in dem binären Vektor pZS97K (pBT542, siehe Beispiel 7) wurde als ein selektierbarer genetischer Marker für die Transformation von Tabak verwendet. Hohe Konzentrationen an Lysin-plus-Threonin hemmen das Wachstum von Sprösslingen aus Tabak-Blattscheiben. Die Expression von aktivem, Lysin- und Threonin-unempfindlicher AKIII-M4 kehrt diese Wachstumshemmung um (siehe Beispiel 7).

[0221] Der binäre Vektor pBT542 wurde durch triparentale Paarung zu Agrobakterium-Stamm LBA4404/pAL4404 transferiert, die Aerobakterium-Transformanten zur Beimpfung von Tabak-Blattscheiben verwendet und die resultierenden transformierten Sprösslinge auf Sprösslingsmedium selektiert, das 3 mM Lysin plus 3 mM Threonin enthielt. Die Sprösslinge wurden zu Wurzelmedium transferiert, das 3 mM Lysin plus 3 mM Threonin enthielt. Aus den Wurzelsprösslingen wurden Pflanzen aufgezogen. Die Blattscheiben der Pflanzen wurden auf Sprösslingsmedium gegeben, das 3 mM Lysin plus 3 mM Threonin enthielt. Es wurden

transformierte Pflanzen durch die Sprösslingsproliferation identifiziert, die um die Blattscheiben herum auf diesem Medium auftraten.

BEISPIEL 14

TRANSFORMATION VON TABAK MIT DEM 35S-PROMOTOR/CTS/CORDAPA-CHIMÄREN GEN

[0222] Das 35S-Promotor/Cab-Leader/cts/cordapA/Nr3`-chimäre Gen wurde als ein 3.0 kb BamH I-Sal I-Fragment isoliert und insertiert in BamH I-Sal I-aufgeschlossenen binären Vektor pZS97K (**Fig.** 2), was das Plasmid pFS852 ergab. Der binäre Vektor ist in Beispiel 7 beschrieben worden.

[0223] Der binäre Vektor, der die chimären Stranggene enthielt, wurde durch triparentale Paarung auf Aerobakterien-Stamm LBA4404/pAL4404 transferiert, der Agrobakterium-Transformant zur Beimpfung von Tabak-Blattscheiben verwendet und die resultierenden transgenen Pflanzen mit Hilfe der in Beispiel 7 ausgeführten Methoden regeneriert.

[0224] Um die Expression des chimären Gens in Blättern der transformierten Pflanzen zu assayieren, wurde Protein entsprechend der Beschreibung in Beispiel 7 extrahiert mit den folgenden Modifikationen. Der Überstand aus der ersten Fällung mit Ammoniumsulfat mit näherungsweise 18 ml wurde mit zusätzlichen 12 ml kalten, gesättigtem Ammoniumsulfat gemischt. Die Mischung wurde für 30 min auf Eis gesetzt und entsprechend der Beschreibung in Beispiel 7 zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Pellets, die das DHDPS-Protein enthielten, erneut in 1 ml TNE suspendiert und durch Passage über eine Sephadex G-25 M-Säule (Column PD-10, Pharmacia) entsalzt.

[0225] Die Blattextrakte wurden auf DHDPS-Protein und Enzymaktivität entsprechend der Beschreibung in Beispiel 4 assayiert. Die Corynebakteria-DHDPS-Enzymaktivität konnte von der Tabak-DHDPS-Aktivität anhand ihrer Unempfindlichkeit gegenüber Lysinhemmung unterschieden werden. Acht von elf Transformanten zeigten Corynebakteria-DHDPS-Expression sowohl als Protein, das über Western-Blot detektiert wurde, als auch als aktives Enzym.

[0226] Es wurden freie Aminosäuren aus Blättern entsprechend der Beschreibung in Beispiel 7 extrahiert. Die Expression von Corynebakterium-DHDPS resultierte zu großen Zunahmen in der Menge von freiem Lysin in den Blättern (Tabelle 8). Allerdings bestand keine gute Korrelation zwischen dem Wert der Expression von DHDPS und der Menge von akkumuliertem freien Lysin. Es wurden um 2- bis 50-fach höhere Mengen an freiem Lysin als bei nicht transformiertem Tabak beobachtet. Es gab ebenfalls eine zweite 2- bis 2,5-fache Zunahme der Menge an Blatt-Gesamtlysin in den Linien, die große Mengen an freiem Lysin zeigten.

TABELLE 8
FS586-Transformanten: 35S-Promoter/Cab-Leader/cts/cordaA/Nr. 3'

Linie	freie Aminosäuren/Blatt K/L	Gesamt-Aminsäuren/Blatt K/L	WESTERN – CORYNE-DHDPS	CORYNE-DHDPS U/MG/HR
normal	0,5	0,8	-	-
FS586-2A	1,0	0,8	-	-
FS586-4A	0,9	0,8	+	6,1
FS586-11B	3,6	0,8	+	3,4
FS586-11D	26	2,0	+	3,5
FS586-13A	2,4	0,8	+	3,5
FS586-19C	5,1	0,8	+	3,1
FS586-22B	> 15	1,5	+	2,3
FS586-30B		0,8	-	-
FS586-38B	18	1,5	++	3,9
FS586-51A	1,3	0,8	-	-
FS586-58C	1,2	0,8	+	5,1

[0227] Die Pflanzen ließ man blühen, selbstbestäuben und in Samen schießen. Es wurde reifer Samen geerntet und auf die Zusammensetzung an freier Aminosäure entsprechend der Beschreibung in Beispiel 8 assayiert. Es gab keinen Unterschied in dem Gehalt an freiem Lysin der Transformanten im Vergleich zu nicht transformiertem Tabaksamen.

BEISPIEL 15

TRANSFORMATION VON TABAK MIT DEN KTI3-PROMOTOR/CTS/CORDAPA- ODER PHASEOLIN-PROMOTOR/CTS/CORDAPA-PLUS-PHASEOLIN-PROMOTOR/CTS/LYSC-M4-CHIMÄREN GENEN

[0228] Die chimären Genkassetten, KTI3-5`-Region/cts/cordA/KTI3-3`-Region und Phaseolin-5`-Region/cts/lysC-M4/Phaseolin-3` sowie Phaseolin-5`-Region/cts/cordapA/Phaseolin-3`-Region und Phaseolin-5`-Region/ctsAysC-M4/Phaseolin-3` (Beispiel 6) wurden in dem binären Vektor pZS97 (**Fig.** 3) kombiniert. Der binäre Vektor ist in Beispiel 8 beschrieben.
[0229] Um dieses zu erzielen, wurde die KTI-5`-Region/cts/cordapA/KTI3-3`-Region-chimäre Genkassette als eine 3.3 kb BamH I-Fragment isoliert und insertiert in BamH I-aufgeschlossenes pBT549 (Beispiel 8), was pFS883 ergab. Dieser binäre Vektor hatte die chimären Gene KTI3-5`-Region/cts/cordaA/KTI3-3`-Region und Phaseolin-5`-Region/cts/lysC-M4/Phaseolin-3`-Region insertiert in entgegengesetzten Orientierungen.
[0230] Die Phaseolin-5`-Region/cts/cordapA/Phaseolin-3`-Region chimäre Genkassette wurde unter Verwendung von Oligonukleotid-Adaptern modifiziert, um die Hind III-Stellen am jeweiligen Ende in BamH I-Stellen umzuwandeln. Die Genkassette wurde sodann als ein 2.7 kb BamH I-Fragment isoliert und insertiert in BamH I-aufgeschlossenem pBT549 (Beispiel 8), was pFS903 ergab. Dieser binäre Vektor hatte beide chimären Gene Phaseolin-5`-Region/cts/cordA/Phaseolin-3`-Region und Phaseolin-5`-Region/cts/lysC-M4/Phaseolin-3`-Region, insertiert in der gleichen Orientierung.
[0231] Die binären Vektoren pFS883 und pFS903 wurden durch triparentale Paarung zu Aerobakterium-Stamm LBA4404/pAL4404 transferiert, die Aerobakterium-Transformanten zur Beimpfung von Tabak-Blattscheiben verwendet und die resultierenden transgenen Pflanzen nach den in Beispiel 7 ausgeführten Methoden regeneriert.
[0232] Um die Expression der chimären Gene in den Samen der transformierten Pflanzen zu assayieren, ließ man die Pflanzen blühen, selbstbestäuben und in Samen schießen. Die Gesamtproteine wurden aus reifen Samen extrahiert und mit Hilfe der in Beispiel 8 beschriebenen Western-Blots analysiert.

[0233] Einundzwanzig von zweiundzwanzig getesteten Transformanten exprimierten das DHDPS-Protein und achtzehn von diesen exprimierten außerdem das AKIII-Protein (Tabelle 8). Es wurde enzymatisch aktive Corynebakteria-DHDPS in reifen Samen bei allen getesteten Linien festgestellt, bei denen das Frotein mit Ausnahme von einem detektiert wurde.

[0234] Um die freie Aminsäure-Zusammensetzung der Samen zu messen, wurden freie Aminosäuren aus reifen Samen extrahiert und entsprechend der Beschreibung in Beispiel 8 analysiert. Es bestand eine gute Korrelation zwischen Transformanten, die höhere Werte sowohl von DHDPS als auch AKIII-Protein exprimierten, und solchen mit höheren Mengen an freiem Lysin und Threonin. Die am stärksten exprimierenden Linien zeigten eine bis zu 3-fache Erhöhung der Mengen an freiem Lysin und bis zu einer 8-fachen Erhöhung der Menge an freiem Threonin in den Samen. Wie in Beispiel 12 beschrieben wurde, wurde eine große Menge an α-Aminoadipinsäure, kennzeichnend für den Lysin-Stoffwechsel, in vielen der transformierten Linien beobachtet (in Tabelle 9 angegeben mit einem Sternchen). Es gab keinen größeren Unterschied in der Zusammensetzung der freien Aminosäure oder dem Wert der Proteinexpression zwischen den Transformanten, die die KTI3- oder Phaseolin-regulatorischen Sequenzen hatten, die die Expression des Corynebakteria-DHDPS-Gens betreiben.

TABELLE 9

FS883-Transformanten: Phaseolin-5'-Region/cts/lysC-M4/Phaseolin-3' KTI3-5'-Region/cts/cordagA/KTI3-3'
FS903-Transformanten: Phaseolin-5'-Region/cts/lysC-M4/Phaseolin-3' Phaseolin-5' Region/cts/corpL/Phaseolin-3'

Linie	freie Aminosäuren/Samen		WESTERN CORYNE.-DHDPS	WESTERN E. COLI AKIII	CORYNE.-DHDPS U/MG/HR	Nachkommenschaft Kan^r:Kan^s
	K/L	T/L				
normal	0,5	1,3	-	-		

FS883-4A	0,9	4,0	+	+		> 15:1
FS883-llA	1,0	3,5	++	++	3,1	3:1
FS883-14B	0,5	2,5	++	++		
FS883-16A*	0,7	10,5	+	+++	0	
FS883-17A*	1,0	5,0	+++	+++	7,0	
FS883-18C*	1,2	3,5	++	+	5,8	3:1
FS883-21A	0,5	1,5	+	+/-		
FS883-26B*	1,1	3,6	++	++	2,4	
FS883-29B	0,5	1,5	+	-	0,4	
FS883-32B	0,7	2,4	++	+	1,5	3:1
FS883-38B*	1,1	11,3	+	++	2,0	
FS883-59Ce	1,4	6,1	+	+	0,5	15:1
FS903-3C	0,5	1,8	+	+++		
FS903-8A*	0,8	2,1	+++	++++		
FS903-9B	0,6	1,8	++	++	4,3	
FS903-10A	0,5	1,5	-	-		
FS903-22E	0,5	1,8	++	++	0,9	
FS903-35B*	0,8	2,1	++	++		
FS903-36B	0,7	1,5	+	-		
FS903-40A	0,6	1,8	+	+		
FS903-41A*	1,2	2,0	++	++		
FS903-42A	0,7	2,2	++	+++	5,4	
FS903-44C	0,5	1,9				
FS903-53B	0,6	1,9				

*freie Aminosäureprobe hatte α-Aminoadipinsäure

[0235] Es wurde die Zusammensetzung von freier Aminosäure und die Expression bakterieller DHDPSund AKIII-Proteine auch in sich entwickelnden Samen zweier Linien analysiert, die als einzelne Genkassetten-Insertionen segregierten (siehe Tabelle 10). Es wurde die Expression des DHDPS-Proteins unter der Kontrolle des KTI3-Promotors zu früheren Zeitpunkten detektiert als das AKIII-Protein unter Kontrolle des Phaseolin-Promotors, wie zu erwarten war. 14 Tage nach dem Blühen waren beide Proteine mit einem hohen Wert exprimiert und es gab eine etwa 8-fache Erhöhung der Menge an freiem Lysin im Vergleich zu normalen Samen. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die gleichzeitige Expression von Lysin-unempfmdlichem DHDPS und Lysin-unempfindlicher AK zur Erzeugung hoher Mengen an freiem Lysin in Samen führt. Freies Lysin setzt die Akkumulation zu noch höheren Mengen allerdings nicht fort. In reifen Samen ist das freie Lysin in der Menge um das 2- bis 3-fache höher als in normalem reifen Samen, wobei sich das Lysin-Abbauprodukt, α-Aminoadipinsäwe, akkumuliert. Diese Ergebnisse liefern einen weiteren Nachweis dafür, dass in Samen ein Lysin-Stoffwechsel erfolgt und die Akkumulation hoher Mengen an freiem Lysin verhindert, das in Transformation erzeugt wird, die Lysin-unempfindliche DHDPS und Lysin-unempfindliche AK exprimieren.

TABELLE 10

Samen in der Entwicklung von FS883-Transformanten: Phaseolin-5'-Region/cts/lysC-M4/Phaseolin-3'-Region KTI3-5'-Region/cts/cordA/KTIS-3'-Region

Linie	Tage nach dem Blühen	freie Aminosäuren/Samen		WESTERN CORYNE. DHDPS	WESTERN E. COLI AKIII
		K/L	T/L		
FS883-18C	9	1,1	2,1	-	-
FS883-18C	10	1,4	3,3	+/-	-
FS883-18C	11	1,4	2,5	+	-
FS883-18C	14	4,3	1,0	++	++
FS883-18C*	reif	1,2	3,5	+++	++
FS883-32B	9	1,3	2,9	+	-
FS883-32B	10	1,6	2,7	+	-
FS883-32B	11	1,4	2,3	+	-
FS883-32B*	14	3,9	1,3	++	++
FS883-32B*	reif	0,7	2,4	+++	++

* freie Aminosäureprobe hat α-Aminoadipinsäure.

BEISPIEL 16

TRANSFORMATION VON CANOLA MIT DEN PHASEOLIN-PROMOTOR/CTS/CORDAPA- UND PHASEOLIN-PROMOTOR/CTS/LYSCM4-CHIMÄREN GENEN

[0236] Die chimären Genkassetten, Phaseolin-5`-Region/cts/cordaA/Phaseolin-3`-Region, Phaseolin-5`-Region/cts/lysC-M4/Phaseolin-3` und Phaseolin-5`-Region/cts/cordapA/Phaseolin-3`-Region plus Phaseolin-5`-Region/cts/lys-M4/Phaseolin-3` (Beispiel 6) wurden in dem binären Vektor pZS199 (**Fig.** 4) insertiert, der ähnlich dem in Beispiel 8 beschriebenen pSZ97K ist. In pzS199 wurde der 35S-Promotor von Blumenkohl-Mosaikvirus ersetzt durch die Zahl der die Expression des NPT II antreibenden Promotors, um eine bessere Expression des Markergens zu gewähren, wobei die Orientierung des Polylinkers, der die mehrfachen Restriktions-Endonukleasestellen enthält, umgekehrt wurde.

[0237] Um Phaseolin-5`-Region/cts/cordaA/Phaseolin-3`-Region-3` zu insertieren wurde die Genkassette als ein 2.7 kb BamH I-Fragment (entsprechend der Beschreibung in Beispiel 15) isoliert und insertiert in BamH I-aufgeschlossenes pZS199, was das Plasmid pFS926 ergab. Der binäre Vektor hatte das chimäre Gen, Phaseolin-5`-Region/cts/cordA/Phaseolin-3`-Region, insertiert in der gleichen Orientierung wie das 35S/NPT II/Nr. 3`-Markergen.

[0238] Um das Phaseolin-5`-Region/cts/lvsC-M4/Phaseolin-3`-Region zu insertieren, wurde die Genkassette als ein 3.3 kb EcoR I zu Spe I-Fragment isoliert und insertiert in EcoR I plus Xba Iaufgeschlossenen pZS199, was das Plasmid pBT593 ergab. Dieser binäre Vektor hatte das chimäre Gen, Phaseolin-5`-Region/cts/lys-M4/Phaseolin-3`-Region, insertiert in der gleichen Richtung wie das 35S/NPT II/Nr. 3`-Markergen.

[0239] Um die 2 Kassetten zu kombinieren, wurde die EcoR I-Stelle von pBT593 in eine BamH I-Stelle unter Verwendung von Oligonukleotid-Adaptoren umgewandelt, der resultierende Vektor mit BamH I geschnitten und die Phaseolin-5`-Region/cts/cordA/Phaseolin-3`-Region-Genkassette als ein 2.7 kb BamH I-Fragment isoliert und insertiert und ergab pBT597. Der binäre Vektor hatte beide chimäre Gene, Phaseolin-5`-Region/cts/cordapA/Phaseolin-3`-Region und Phaseolin-5`-Region/cts/lysC-M4/Phaseolin-3`-Region, insertiert in der gleichen Orientierung wie das 35S/NPT II/Nr. 3`-Markergen.

[0240] Es wurde die Brassica napus-Zuchtsorte „Westar" durch Co-Kultivierung von Sämlingsstücken mit endschärftem Aerobakterium tumefaciens-Stamm LBA4404, das den geeigneten binären Vektor trägt, durch Co-Kultivierung transformiert.

[0241] Es wurde B. napus-Samen durch Rühren in 10% Chlorox, 0,1% SDS für 30 min sterilisiert und dann mit sterilem destilliertem Wasser gründlich gespült. Die Samen wurden auf sterilem Medium, das 30 mM $CaCl_2$ und 1,5% Agar enthielt zum Keimen gebracht und für 6 Tage bei Dunkelheit und 24°C aufgezogen.

[0242] Es wurden flüssige Kulturen von Aerobakterium für die Pflanzentransformation über Nacht bei 28°C in einem „Minimal A"-Medium aufgezogen, das 100 mg/l Kanamycin enthielt. Die Bakterienzellen wurden durch Zentrifugation pelletisiert und bei einer Konzentration von 108 Zellen/ml in flüssigem „Murashige and Skoog Minimal Organic"-Medium erneut suspendiert, das 100 µM Acetosyringon enthielt.
[0243] B. napus-Sämlings-Keimachsen wurden in 5mm-Segmente geschnitten, die sofort in die bakterielle Suspension eingebracht wurden. Nach 30 min wurden die Keimachsenstücke aus der bakteriellen Suspension entnommen und in BC-35-Kallus-Medium gegeben, das 100 µM Acetosyringon enthielt. Das Pflanzengewebe und die Aerobakteria wurden für 3 Tage bei Dämmerlicht und 24°C co-kultiviert.
[0244] Die Co-Kultivierung wurde beendet, indem die Keimachsenstücke in BC-35-Kallus-Medium gegeben wurden, das 200 mg/l Carbenicillin enthielt, um die Agrobakterien zu töten, und 25 mg/l Kanamycin enthielt, um auf ein transformiertes Pflanzenzellwachstum zu selektieren. Die Sämlingsstücke wurden auf diesem Medium für 3 Wochen bei 24°C unter Dauerlicht inkubiert.
[0245] Nach 3 Wochen wurden die Segmente in ein BS-48-Regenerationsmedium, das 200 mg/l Carbenicillin und 25 mg/l Kanamycin enthielt. Das Pflanzengewebe wurde für 2 Wochen auf frischem selektiven Regenerationsmedium unter den gleichen Kulturbedingungen subkultiviert, wie sie für das Kallus-Medium beschrieben wurden. Mutmaßlich transformierte Kalli wuchsen rasch auf dem Regenerationsmedium; sobald die Kalli einen Durchmesser von etwa 2 mm erreichten, wurden sie von den Keimachsenstücken entfernt und in das gleiche Medium ohne Kanamycin gegeben.
[0246] Es begannen Sprösslinge innerhalb mehrerer Wochen nach Transfer in das BS-48-Regenerationsmedium aufzutreten. Sobald die Sprösslinge scheinbare Stiele ausgebildet hatten, wurden sie aus den Kalli geschnitten, in ein MSV-1A-Verlängerungsmedium gegeben du bis zu einer 16.8 h-Photoperiode bei 24°C bewegt.
[0247] Sobald die Sprösslinge verlängerte mehrere Stängelglieder hatten, wurden sie über der Agaroberfläche geschnitten und die Schnittenden in „Rootone" eingetaucht. Die behandelten Sprösslinge wurden direkt in nasses Metro-Mix 350-bodenfreies Topfmedium gepflanzt. Die Töpfe wurden mit Kunststoffbeuteln abgedeckt, die abgenommen wurden, wenn die Pflanzen eindeutig wuchsen, und zwar nach etwa 10 Tagen. Die Ergebnisse der Transformation sind in Tabelle 11 gezeigt. Es wurden transformierte Pflanzen mit den jeweiligen binären Vektoren erhalten.
[0248] Es wurden Pflanzen unter einer 16 : 8 h-Photoperiode mit einer Tageszeittemperatur von 23°C und einer Nachtzeittemperatur von 17°C aufgezogen. Sobald die Hauptblütenstängel sich zu Strecken begannen wurden sie mit einem Maschen-Pollen-Containment-Beutel abgedeckt, um ein Auskreuzen zu verhindern. Die Selbstbestäubung wurde erleichtert, indem die Pflanzen jeden Tag mehrere Male geschüttelt wurden. Etwa 3 Monate nach dem Pflanzen wurden reife Samen geerntet, die von den Selbstbestäubungen stammten.

MINIMAL-A-BAKTERIENWACHSTUMSMEDIUM

[0249] Auflösen in destilliertem Wasser:
10,5 g Kaliumphosphat-zweibasisch
4,5 g Kaliumphosphat-einbasisch
1,0 g Ammoniumsulfat
0,5 g Natriumcitrat-Dihydrat
Auffüllen auf 979 ml mit destilliertem Wasser
Autoklav
Hinzufügen von 20 ml Filter-sterilisierter 10%iger Sucrose
Hinzufügen von 1 ml Filter-sterilisierten 1 M $MgSO_4$

BRASSICA KALLUS-MEDIUM BC-35

[0250] Pro Liter:
„Murashige and Skoog Minimal"-organisches Medium (MS-Salze, 100 mg/l i-Inositol, 0,4 mg/l Thiamin; GIBCO # 510-3118)
30 g Sucrose
18 g Mannitol
0,5 mg/l 2,4-D
0,3 mg/l Kinetin
0,6% Agarose
pH 5,8

BRASSICA-REGENERATIONSMEDIUM BS-48

[0251] „Murashige and Skoog Minimal"-organisches Medium
Gamborg B5-Vitamine (SIGMA # 1019)
l0 g Glucose
250 mg Xylose
600 mg MES
0,4% Agarose
pH 5,7
Filter-sterilisieren und Zusetzen nach dem Autoklavieren:
2,0 mg/l Zeatin
0,1 mg/l IAA

BRASSICA-SPRÖSSLINGS-ELONGATIONSMEDIUM MSV-1A

[0252] „Murashige and Skoog Minimal"-organisches Medium
Gamborg B5-Vitamine
10 g Sucrose
0,6% Agarose
pH 5,8

TABELLE 11
Canola-Transformanten

binärer Vektor	Zahl der Schnitt-enden	Zahl von KAN^R KALLI	Zahl der Sprösslings-KALLI	Zahl der Pflanzen
pZS199	120	41	5	2
pFS926	600	278	52	28
pBT593	600	70	10	3
pBT597	600	223	40	23

BEISPIEL 17

TRANSFORMATION VON MAIS UNTER VERWENDUNG DES CHIMÄREN LYSC-M4-GENS ALS EIN SELEKTIERBARER MARKER

[0253] Es wurden embryogene Kalluskulturen aus unreifen Embryos iniziiert (etwa 1,0 bis 1,5 mm), ausgeschnitten aus Kernen einer Getreidelinieaufzucht, um eine Reaktion von „Typ II-Kallus"-Gewebekultur zu liefern. Die Embryos wurden 10 bis 12 Tage nach der Bestäubung aufgeschnitten und mit dem Achsenende abwärts und in Kontakt mit dem Agarose-verfestigten N6-Medium [Chu et al. (1974) Sci Sin 18: 659–668] ergänzt mit 0,5 mg/l 2,4-D (N6-0,5). Die Embryos wurden in der Dunkelheit bei 27°C gehalten. Es wurde brüchiges embryogenes Kallus, bestehend aus undifferenzierten Massen von Zellen mit somatischen Proembryos und somatischen Embryos, geboren auf Suspensorstrukturen, aus den Scutellum der unreifen Embryos proliferiert. Die klonalen embryogenen Kalli, die von einzelnen Embryos isoliert wurden, wurden identifiziert und auf N6-0,5-Medium alle 2 bis 3 Wochen subkultiviert.
[0254] Die Methode des Partikelbeschusses wurde angewendet, um Gene in die Kallus-Kulturzellen zu transferieren. Für diese Versuche wurde ein Biolistic, PDS-1000/He (BioRad Laboratories, Hercules, CA) verwendet.
[0255] Das Plasmid pBT573, welches das chimäre Gen HH534-5`-Region/mcts/lysC-M4/HH2-1-3`-Region (siehe Beispiel 6) enthielt, das für die konstitutive Genexpression in Korn zugeschnitten war, wurde auf der Oberfläche von Goldpartikeln abgeschieden. Um dieses zu erreichen, wurden 2,5 µg pBT573 (in Wasser bei einer Konzentration von etwa 1 mg/ml) zu 25 ml Goldpartikeln (mittlerer Durchmesser 1,5 µm) suspendiert in Wasser (60 mg Gold pro ml) zugesetzt. Danach wurde Calciumchlorid (25 ml einer 2,5 M Lösung) und Spermidin (10 ml einer 1,0 M Lösung) der Gold-DNA-Suspension zugesetzt, als man das Röhrchen vortexierte. Die Goldpartikel wurden in einer Mikrozentrifuge für 10 Sekunden zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Goldpartikel wurden danach erneut in 200 ml absolutem Ethanol suspendiert, wiederum zentrifugiert und der

Überstand entfernt. Schließlich wurden die Goldpartikel erneut in 25 ml absolutem Ethanol suspendiert und 2 Mal für 1 Sekunde mit Ultraschall behandelt. Es wurden sodann 5 µl der mit DNA beschichteten Goldpartikel auf jeweil ein Makro-Trägerplättchen gegeben und das Ethanol abgedampfr und die zurückbleibenden, mit DNA beschichteten Goldpartikel auf den Plättchen getrocknet.

[0256] Der embryogene Kallus (aus der mit #132.2.2 bezeichneten Kalluslinie) wurde in einer kreisförmigen Fläche mit einem Durchmesser von etwa 6 cm in der Mitte einer Petri-Schale von 100 mm × 20 mm angeordnet, die N6-0,5-Medium ergänzt mit 0,25 M Sorbit und 0,25 M Mannit enthielt. Das Gewebe wurde auf dieses Medium für 2 Stunden vor dem Beschuss als eine Vorbehandlung gegeben und verblieb auf dem Medium während der Beschussprozedur. Am Ende der zweistündigen Vorbehandlungszeit wurde die Petri-Schale, die das Gewebe enthielt, in die Kammer des PDS-1000/He gegeben. Die Luft in der Kammer wurde sodann bis zu einem Vakuum von 28 inch Hg evakuiert. Der Makroträger wurde mit einer Helix-Druckwelle unter Verwendung einer Berstmembran beschleunigt, die zum Bersten kam, wenn der He-Druck in dem Schockröhrchen 1.100 psi erreichte. Das Gewebe wurde ungefähr 8 cm von dem Stop-Schirm entfernt angeordnet. Es wurden 4 Platten mit Gewebe mit den DNA-beschichteten Goldpartikeln beschossen. Unmittelbar nach dem Beschuss wurde das Kallusgewebe in das N6-0,5-Medium ohne ergänzendes Sorbit oder Mannit gegeben.

[0257] 7 Tage nach dem Beschuss wurden kleine Klumpen (Durchmesser 2 bis 4 mm) von Kallusgewebe in ein N6-0,5-Medium ohne Prolin gegeben, jedoch jeweils ergänzt mit 2 mM Lysin und Threonin (LT). Das Gewebe wuchs auf diesem Medium langsam weiter und wurde in frisches N6-0,5-Medium, alle 2 Wochen ergänzt mit LT, gegeben. Nach 12 Wochen wurden 2 Klone von aktiv wachsendem Kallus auf 2 separaten Platten identifiziert, die LT-ergänztes Medium enthielten. Diese Klone wuchsen bei Subkultivierung auf dem selektiven Medium weiter. Das Vorhandensein des lysC-M4-Gens in den selektierten Klonen wurde mit Hilfe der PCR-Analyse bestätigt. Das Kallus wurde in ein Medium gegeben, das die Pflanzenregeneration fördert.

BEISPIEL 18

TRANSFORMATION VON KORN MIT DEM KONSTITUTIVEN KORN-PROMOTOR/CTS/ECODAPA- UND KONSTITUTIVEN KORN-PROMOTOR-CTS/LYSC-M4

[0258] Die chimären Genkassetten, HH534-5`-Region/mcts/ecodaA/HH2-1-3`-Region plus HH534-5`-Region/mcts/lysC-M4/HH2-1-3`-Region (Beispiel 6) wurden in den Vektor pGem9z insertiert, um einen Korn-Transformationsvektor zu erzeugen. Es wurde Plasmid pBT583 (Beispiel 6) aufgeschlossen mit Sal I und ein 1850 bp-Fragment, das die Genkassette HH534-5`-Region/mcts/ecodapA/HH2-1-3`-Region-Genkassetten enthielt, isoliert. Dieses DNA-Fragment wurde in pBT573 (Beispiel 6) insertiert, das die HH534-5`-Region/mcts/lysC-M4/HH2-1-3`-Region enthält, und zwar aufgeschlossen mit Xho I. Der resultierende Vektor mit beiden chimären Genen in der gleichen Orientierung wurde bezeichnet als pBT586.

[0259] Es wurde Vektor pBT586 in embryogenes Korn-Kallusgewebe unter Anwendung der Methode des Partikelbeschusses eingeführt. Die Herstellung der embryogenen Kalluskultur und die Ermittlung der Parameter für den Partikelbeschuss entsprachen denen, wie sie in Beispiel 13 beschrieben wurden.

[0260] Es wurde jeder der 2 Plasmidvektoren, die selektierbare Marker enthalten, in den Transformationen zur Anwendung gebracht. Eines der Plasmide, pALSLUC [Fromm et al. (1990) Biotechnology 8: 833–839] enthielt ein cDNA-Gen der Mais-Acetolactatsynthase (ALS). Die ALS-cDNA war in vitro mutiert worden, so dass das Enzym, das durch das Gen codiert wurde, gegenüber Chlorsulfuron beständig war. Dieses Plasmid enthielt auch ein Gen, das den 35S-Promotor vom Blumenkohl-Mosaikvirus nutzte und die 3`-Region des Nopalin-Synthasegens, um eine Leuchtkäfer-Luciferase-codierende Region zu exprimieren [de Wet et al. (1987) Molec. Cell Biol. 7: 725–737]. Das andere Plasmid, pDETRIC, enthielt das bloße Gen von Streptomyces hygroscopicus, das Beständigkeit gegenüber dem Herbicid Glufosinat vermittelt [Thompson et al. (1987 The EMBO Journal 6: 2519–2523]. Das bakterielle Gen hatte sein Translationskodon von GTG zu ATG zur geeigneten Translationsinitiierung in Pflanzen geändert [De Block et al. (1987) The EMBO Journal 6: 2513–2518]. Das bloße Gen wurde durch den 35S-Promotor von Blumenkohl-Mosaikvirus getrieben und nutzte das Abbruch- und Polyadenylierungssignal vom Octopin-Synthasegen von Aerobakterium tumefaciens.

[0261] Zum Beschuss wurden 2,5 µg jedes Plasmids, pBT586 und eines der zwei selektierbaren Markerplasmide gemeinsam auf der Oberfläche der Goldpartikel entsprechend der Beschreibung in Beispiel 13 abgeschieden. Der Beschuss der embryogenen Gewebekulturen wurde ebenfalls in Beispiel 13 beschrieben.

[0262] Sieben Tage nach dem Beschuss wurde das Gewebe in ein selektives Medium gegeben. Das mit dem selektierbaren Marker pALSLUC beschossene Gewebe wurde in das N6-0,5-Medium gegeben, das Chlorsulfuron (30 ng/l) enthielt und kein Casein oder Prolin. Das mit dem selektierbaren Marker, pDETRIC, beschossene Gewebe wurde in N6-0,5-Medium gegeben, das 2 mg/l Glufosinat enthielt und kein Casein oder Prolin. Das Gewebe wuchs langsam auf diesen selektiven Medien weiter. Nach weiteren 2 Wochen wurde das Gewebe in frisches N6-0,5-Medium gegeben, das selektive Mittel enthielt.

[0263] Es konnten Chlorsulfuron- und Glufosinat-beständige Kallus-Klone nach weiteren 6 bis 8 Wochen

identifiziert werden. Diese Klone wuchsen weiter, nachdem sie in die selektiven Medien gegeben wurden.

[0264] Das Vorhandensein von pBT586 in den transformierten Klonen ist mit Hilfe der PCR-Analyse bestätigt worden. Die Funktionalität des eingeführten AK-Enzyms wurde durch Ausstreichen transformierter Klone auf N6-0,5-Medien getestet, die jeweils 2 mM Lysin und Threonin enthielten (LT-Selektion; siehe Beispiel 13). Alle diese Klone konnten auf LT-Medium wachsen, was darauf hinweist, dass die E. coli-Aspartatkinase exprimiert war und einwandfrei funktionierte. Um zu prüfen, ob das E. coli-DHDPS-Enzym funktionierte, wurde transformierter Kallus auf N6-0,5-Medien ausgestrichen, die 2 µM 2-Aminoethylcystein (AEC) enthielten, ein Lysinanalog und potenter Inhibitor für Pflanzen-DHDPS. Das transformierte Kallusgewebe war gegenüber AEC beständig, was darauf hinweist, dass das eingeführte DHDPS, das etwa 16-fach weniger empfindlich gegenüber AEC als das Pflanzenenzym war, erzeugt worden ist und funktionell war.

[0265] Es wurden von mehreren transformierten Klonen Pflanzen regeneriert und bis zur Reife aufgezogen.

BEISPIEL 19

TRANSFORMATION VON SOJABOHNE MIT DEN PHASEOLIN-PROMOTOR/CTS/CORDAPA-UND PHASEOLIN-PROMOTOR/CTS/LYSC-M4-CHIMÄREN GENEN

[0266] Die chimären Genkassetten, Phaseolin-5`-Region/cts/cordaA/Phaseolin-3`-Region plus Phaseolin-5`-Region/cts/lysC-M4/Phaseolin-3` (Beispiel 6) wurden in den Sojabohnen-Transformationsvektor pBT603 (**Fig.** 5) insertiert. Dieser Vektor hatte ein Sojabohnen-Transformationsmarkergen, das aus dem 35S-Promotor von der Blumenkohl-Mosaikvirus-antreibenden Expression des E. coli-β-Glucwonidasegens [Jefferson et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8447-8451] mit der Nr. 3`-Region in einem modifizierten pGEM9Z-Plasmid bestand.

[0267] Um die Phaseolin-5`-Region/cts/lysC-M4/Phaseolin-3`-Region zu insertieren, wurde die Genkassette als ein 3.3 kb Hind III-Fragment isoliert und insertiert in Hind III-aufgeschlossenes pBT603, was das Plasmid pBT609 ergab. Dieser binäre Vektor hatte das chimäre Gen Phaseolin-5`-Region/cts/lysC-M4/Phaseolin-3`-Region insertiert in der entgegengesetzten Orientierung von dem 35S/GUS/Nr. 3`-Markergen.

[0268] Um die Phaseolin-5`-Region/cts/cor/Phaseolin-3`-Region-3` zu insertieren, wurde die Genkassette als ein 2.7 kb BamH I-Fragment (entsprechend der Beschreibung in Beispiel 15) isoliert und insertiert in BamH I-aufgeschlossenes pBT609, was das Plasmid pBT614 ergab. Dieser Vektor hatte beide chimären Gene, Phaseolin-5`-Region/cts/cordapA/Phaseolin-3`-Region, insertiert in der gleichen Orientierung und beide befanden sich in der entgegengesetzten Orientierung zum 35S/GUS/Nr. 3`-Markergen.

[0269] Es wurde Sojabohne mit Plasmid pBT614 nach der in der US-P-5 015 580 beschriebenen Prozedur transformiert. Die Sojabohnen-Transformation wurde ausgeführt von der Agracetus Company (Middleton, WI).

BEISPIEL 20

ISOLATION EINES PFLANZEN-LYSIN-KETOGLUTARAT-REDUKTASEGENS

[0270] Die Lysin-Ketoglutarat-Reduktase (LKR)-Enzymaktivität wurde im unreifen Endosperm von sich entwickelnden Maissamen beobachtet [Arruda et al. (1982) Plant Physiol. 69: 988–989]. Die LKR-Aktivität nahm ab dem Einsetzen der Endospermentwicklung scharf zu, erreichte einen Spitzenwert nach etwa 20 Tagen nach Bestäubung und nahm dann ab [Arruda et al. (1983) Phytochemistry 22: 2687–2689].

[0271] Um das Korn-LKR-Gen zu klonen, wurde aus den sich entwickelnden Samen 19 Tage nach der Bestäubung RNA isoliert. Diese RNA wurde zu den Clontech Laboratories, Inc., (Palo Alto, CA) für die übliche Synthese einer cDNA-Bank in den Vektor-Lambda Zap II geschickt. Die Umwandlung der Lambda Zap II-Bank in eine Phagemidbank und anschließend in eine Plasmidbank wurde unter Befolgung des von Clontech vorgegebenen Protokolls erreicht. Sobald die Umwandlung in eine Plasmidbank erreicht war, trugen die erhaltenen Ampicillin-beständigen Klone den cDNA-Insert in dem Vektor pBluescript SK(–). Die Expression der cDNA steht unter Kontrolle des lacZ-Promotors auf dem Vektor.

[0272] Es wurden 2 Phagemidbanken unter Verwendung der Mischungen der Lambda Zap II-Phage und der filamentaren Helferphage von 100 µl bis 1 µl erzeugt. Es wurden 2 zusätzliche Banken unter Verwendung von Mischungen von 100 µl Lambda Zap II zu 10 µl Helferphage und 20 µl Lambda Zap II zu 10 µl Helferphage erzeugt. Diese Titer der Phagemidpräparate waren unabhängig von der verwendeten Mischung ähnlich und waren etwa 2×10^3 Ampicillin-beständige-Transfektanten pro ml mit E. coli-Stamm XL1-Blue als den Wirt und etwa 1×10^3 mit DE126 (siehe nachfolgend als Wirt).

[0273] Um Klone auszuwählen, die das LKR-Gen tragen, wurde ein speziell zugeschnittener E. coli-Wirt DE 126 konstruiert. Die Konstruktion von DE 126 erfolgte in mehreren Stufen.

(1) Es wurde ein generalisierter transduzierender Stamm von Coliphage Plvir durch Infektion einer Kultur von TST1 [F^-, araD139, delta(argF-lac) 205, flb5301, ptsF25, relA1, rpsL 150, malE52::Tn10, deoCl, λ^-] E.

coli Genetic Stock Center # 6137) unter Anwendung einer Standardmethode (die Methoden siehe bei J. Miller, Experiments in Molecular Genetics) erzeugt.
(2) Dieser Phagenstamm wurde als Spender in einer Transduktionskreuzung (die Methode siehe bei J. Miller, Experiments in Molecular Genetics) mit Stamm GIF106M1 [F_, arg-, ilvA296, lysC1001, thrA1101, metL1000, λ^-, rpsL9, malT1, xyl-7, mtl-2, thil(?), supE44(?)] E. coli Genetic Stock Center # 5074) als den Rezipienten verwendet.
Es wurden Rekombinanten auf reichem Medium selektiert [L ergänzt mit DAP], das das antibiotische Tetracyclin enthielt. Das Transposon Tn10, das zur Tetracyclinbeständigkeit beiträgt, wurde in das malE-Gen des Stammes TST1 insertiert. Tetracyclin-beständige Transduktanten, die ebenfalls von dieser Kreuzung deriviert waren, enthalten wahrscheinlich bis zu 2 min des E. coli-Chromosoms in Nachbarschaft von malE. Die Gene malE und lysC wurden um weniger als 0,5 min separiert, und zwar ausreichend innerhalb der Cotransduktionsdistanz.
(3) Es wurden 200 Tetracyclin-beständige Transduktanten phänotypisch hergestellt; eine geeignete Fermentation und Nährstoffmerkmale bewertet. Der Rezipientenstamm GIF106M1 ist vollständig ohne Aspartokinase-Isozyme in Folge von Mutationen in thrA, metL und fand erfordert daher das Vorhandensein von Threonin, Methionin, Lysin und Meso-Diaminopimelinsäure (DAP) zum Wachstum. Von Transduktanten, die vererbtes $lysC^+$ mit malE::Tn10 von TST1 hatten, war zu erwarten, dass sie auf einem Minimalmedium wachsen, das Vitamin B1, L-Arginin, L-Isoleucin und L-Valin zusätzlich zu Glucose enthält, das als eine Kohlenstoff und Energiequelle dient. Darüber hinaus werden Stämme, die die genetische Konstitution von $lysC^+$. $metL^-$ und $thrA^-$ haben, lediglich die Lysin-empfindliche Aspartokinase exprimieren. Somit sollte der Zusatz von Lysin zum Minimalmedium das Wachstum des $lysC^+$-Rekombinanten verhindern, indem es zu einem Aushungern für Threonin, Methionin und DAP führt. Von den untersuchten 200 Tetracyclin-beständigen Transduktanten wuchsen 49 auf dem Minimalmedium ohne Threonin, Methionin und DAP. Darüber hinaus wurden alle 49 durch Zusatz von L-Lysin zum Minimalmedium gehemmt. Einer dieser Transduktanten wurde mit DE125 bezeichnet. DE125 hatte den Phänotyp von Tetracyclinbeständigkeit, Wachstumsanforderungen für Arginin, Isoleucin und Valin und Empfindlichkeit gegenüber Lysin. Der Genotyp dieses Stammes ist F" malE52::Tn10 arg- i1vA296 thrA1101 metL1000 lambda-rpsL9 malT1 xyl-7 mtl-2 thil(?) supE44 (?).
(4) Dieser Schritt umfasst die Erzeugung eines männlichen Abkömmlinges des Stammes DE125. Der Stamm DE125 wurde mit dem männlichen Stamm AB1528 [F'16/delta (gpt-proA) 62, lacY1 or lacZ4, glnV44, galK2 rac^- (?), hisG4, rfbd1, mgl-51, kdgK51(?), ilvC7, araE3, thi-1] (E. coli Genetic Stock Center #1528) nach der Methode der Konjugation gepaart. F'16 trägt das i1vGMEDAYC-Gen-Cluster. Die zwei Stämme wurden auf reichem Medium, das für das Wachstum jedes Stammes permissiv war, überkreuz gestreift. Nach Inkubation wurde das Plättchen replica-beschichtet auf ein synthetisches Medium, das Tetracyclin, Arginin, Vitamin B1 und Glucose enthielt. Auf diesem Medium kann DE 125 nicht wachsen, da es Isoleucin nicht synthetisieren kann. Das Wachstum von AB1528 wird durch Einschluss des antibiotischen Tetracyclins und Weglassung von Prolin und Histidin aus dem synthetischen Medium verhindert. Ein Fleck von Zellen wuchs auf diesem selektiven Medium. Diese rekombinanten Zellen wurden auf dem gleichen Medium einer Isolation einer einzelnen Kolonie unterzogen. Der Phänotyp eines der Klone wurde als Ilv^+, Arg^-, TetR, Lysin-empfindliche spezifische männliche Phage (MS2)-empfindlich, übereinstimmend mit dem einfachen Transfer von F' 16 von AB 1528 zu DE 125 ermittelt. Dieser Klon wurde mit DE126 bezeichnet und hatte den Genotyp F`16/malE52::Tn10, arg-, i1vA296, thrA1101, metL100, lys^+, λ^-, rpsL9, malT1, xyl-7, mtl-2, thi-1?, sunE44?. Dieser wird durch 20 µg/ ml L-Lysin in einem synthetischen Medium gehemmt.

[0274] Um für Klone von der Korn-cDNA-Bank zu selektieren, die das LKR-Gen tragen, wurden 100 Liter der Phagemidbank gemischt mit 100 µl einer Kultur von DE126 über Nacht, aufgezogen in L-Brühe und die Zellen auf synthetischem Medium ausgestrichen, das Vitamin B1, L-Arginin, Glucose als Kohlenstoff- und Energiequelle, 100 µg/ml Ampicillin und L-Lysin mit 20, 30 oder 40 µg/ ml enthielt. Es wurden 4 Plättchen mit jeder der 3 verschiedenen Lysinkonzentrationen hergestellt. Die Menge an Phagemid und DE126-Zellen sollte nach den Erwartungen etwa 1×10^5 Ampicillin-beständige Transfektanten pro Plättchen liefern. Zehn bis dreißig Lysin-beständige Kolonien wuchsen pro Plättchen (etwa 1 Lysin-beständig pro 5.000 Ampicillin-beständige Kolonien).
[0275] Es wurde Plasmid-DNA von 10 unabhängigen Klonen isoliert und retransformiert in DE126. Sieben von den zehn DNA lieferten Lysin-beständige Klone, was demonstriert, dass das Lysin-beständige Merkmal auf dem Plasmid getragen wurde. Die veröffentlichte Größe von Korn-LKR beträgt etwa 140.000 Dalton, was eine mRNA von mindestens 3.8 kb erfordert. Die Restriktions-Enzymanalyse der DNA's zeigte, dass das Klon 1ID ein Plasmid mit einem Insert von näherungsweise 4 kb von Korn-DNA enthielt, was groß genug war, um eine cDNA in voller Länge zu tragen.

SEQUENZLISTE

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER: E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: NUKLEINSÄURE-FRAGMENTE UND METHODEN ZUR ERHÖHUNG DES LYSIN- UND THREONINGEHALTES DES SAMENS VON PFLANZEN

(iii) ZAHL DER SEQUENZEN: 24

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

(A) ADRESSE: E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY

(B) STRASSE: 1007 MARKET STREET

(C) STADT: WILMINGTON

(D) STAAT: DELAWARE

(E) LAND: U.S.A.

(F) ZIP: 19898

(v) COMPUTER-LESBARES FORMAT:

(A) ART DES MEDIUMS: DISKETTE, 3.50“

(B) COMPUTER: MACINTOSH

(C) BETRIEBSSYSTEM: MACINTOSH, 6.0

(D) SOFTWARE: MICROSOFT WORD, 4.0

(vi)AKTUELLE ANMELDEDATEN:

(A) ANMELDENUMMER: BB-1037-A

(B) EINREICHUNGSTAG:

(C) KLASSIFIKATION:

(vii) FRÜHERE ANMELDEDATEN:

(A) ANMELDENUMMER: 07/855,414

(B) EINREICHUNGSTAG: 19. MÄRZ 1992

(viii) ANWALT/VERTRETER-INFORMATION:

(A) NAME: LINDA AXAMETHY FLOYD

(B) REGISTRIERNUMMER: 33,692

(C) BEZUGSZEICHEN/AKTENNUMMER: BB-1037-A

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSVERBINDUNGEN:

(A) TELEFON: 302-992-4929

(B) TELEFAX: 302-892-7949

(C) TELEX: 835420

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR:1:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIK:

(A) LÄNGE: 1350 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG-CHARAKTER: einsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (Genom)

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) ORT: 1.1350

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:1:

```
ATG GCT GAA ATT GTT GTC TCC AAA TTT GGC GGT ACC AGC GTA GCT GAT    48
Met Ala Glu Ile Val Val Ser Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val Ala Asp
  1               5                  10                  15

TTT GAC GCC ATG AAC CGC AGC GCT GAT ATT GTG CTT TCT GAT GCC AAC    96
Phe Asp Ala Met Asn Arg Ser Ala Asp Ile Val Leu Ser Asp Ala Asn
             20                  25                  30

GTG CGT TTA GTT GTC CTC TCG GCT TCT GCT GGT ATC ACT AAT CTG CTG   144
Val Arg Leu Val Val Leu Ser Ala Ser Ala Gly Ile Thr Asn Leu Leu
         35                  40                  45

GTC GCT TTA GCT GAA GGA CTG GAA CCT GGC GAG CGA TTC GAA AAA CTC   192
Val Ala Leu Ala Glu Gly Leu Glu Pro Gly Glu Arg Phe Glu Lys Leu
     50                  55                  60
```

```
GAC GCT ATC CGC AAC ATC CAG TTT GCC ATT CTG GAA CGT CTG CGT TAC   240
Asp Ala Ile Arg Asn Ile Gln Phe Ala Ile Leu Glu Arg Leu Arg Tyr
 65                  70                  75                  80

CCG AAC GTT ATC CGT GAA GAG ATT GAA CGT CTG CTG GAG AAC ATT ACT   288
Pro Asn Val Ile Arg Glu Glu Ile Glu Arg Leu Leu Glu Asn Ile Thr
                 85                  90                  95

GTT CTG GCA GAA GCG GCG GCG CTG GCA ACG TCT CCG GCG CTG ACA GAT   336
Val Leu Ala Glu Ala Ala Ala Leu Ala Thr Ser Pro Ala Leu Thr Asp
            100                 105                 110

GAG CTG GTC AGC CAC GGC GAG CTG ATG TCG ACC CTG CTG TTT GTT GAG   384
Glu Leu Val Ser His Gly Glu Leu Met Ser Thr Leu Leu Phe Val Glu
        115                 120                 125

ATC CTG CGC GAA CGC GAT GTT CAG GCA CAG TGG TTT GAT GTA CGT AAA   432
Ile Leu Arg Glu Arg Asp Val Gln Ala Gln Trp Phe Asp Val Arg Lys
    130                 135                 140

GTG ATG CGT ACC AAC GAC CGA TTT GGT CGT GCA GAG CCA GAT ATA GCC   480
Val Met Arg Thr Asn Asp Arg Phe Gly Arg Ala Glu Pro Asp Ile Ala
145                 150                 155                 160

GCG CTG GCG GAA CTG GCC GCG CTG CAG CTG CTC CCA CGT CTC AAT GAA   528
Ala Leu Ala Glu Leu Ala Ala Leu Gln Leu Leu Pro Arg Leu Asn Glu
                165                 170                 175

GGC TTA GTG ATC ACC CAG GGA TTT ATC GGT AGC GAA AAT AAA GGT CGT   576
Gly Leu Val Ile Thr Gln Gly Phe Ile Gly Ser Glu Asn Lys Gly Arg
            180                 185                 190

ACA ACG ACG CTT GGC CGT GGA GGC AGC GAT TAT ACG GCA GCC TTG CTG   624
Thr Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Thr Ala Ala Leu Leu
        195                 200                 205
```

```
GCG GAG GCT TTA CAC GCA TCT CGT GTT GAT ATC TGG ACC GAC GTC CCG   672
Ala Glu Ala Leu His Ala Ser Arg Val Asp Ile Trp Thr Asp Val Pro
    210                 215                 220

GGC ATC TAC ACC ACC GAT CCA CGC GTA GTT TCC GCA GCA AAA CGC ATT   720
Gly Ile Tyr Thr Thr Asp Pro Arg Val Val Ser Ala Ala Lys Arg Ile
225                 230                 235                 240

GAT GAA ATC GCG TTT GCC GAA GCG GCA GAG ATG GCA ACT TTT GGT GCA   768
Asp Glu Ile Ala Phe Ala Glu Ala Ala Glu Met Ala Thr Phe Gly Ala
                245                 250                 255

AAA GTA CTG CAT CCG GCA ACG TTG CTA CCC GCA GTA CGC AGC GAT ATC   816
Lys Val Leu His Pro Ala Thr Leu Leu Pro Ala Val Arg Ser Asp Ile
            260                 265                 270

CCG GTC TTT GTC GGC TCC AGC AAA GAC CCA CGC GCA GGT GGT ACG CTG   864
Pro Val Phe Val Gly Ser Ser Lys Asp Pro Arg Ala Gly Gly Thr Leu
        275                 280                 285

GTG TGC AAT AAA ACT GAA AAT CCG CCG CTG TTC CGC GCT CTG GCG CTT   912
Val Cys Asn Lys Thr Glu Asn Pro Pro Leu Phe Arg Ala Leu Ala Leu
    290                 295                 300

CGT CGC AAT CAG ACT CTG CTC ACT TTG CAC AGC CTG AAT ATG CTG CAT   960
Arg Arg Asn Gln Thr Leu Leu Thr Leu His Ser Leu Asn Met Leu His
305                 310                 315                 320

TCT CGC GGT TTC CTC GCG GAA GTT TTC GGC ATC CTC GCG CGG CAT AAT  1008
Ser Arg Gly Phe Leu Ala Glu Val Phe Gly Ile Leu Ala Arg His Asn
                325                 330                 335
```

```
ATT TCG GTA GAC TTA ATC ACC ACG TCA GAA GTG AGC GTG GCA TTA ACC  1056
Ile Ser Val Asp Leu Ile Thr Thr Ser Glu Val Ser Val Ala Leu Thr
            340                 345                 350

CTT GAT ACC ACC GGT TCA ACC TCC ACT GGC GAT ACG TTG CTG ACG CAA  1104
Leu Asp Thr Thr Gly Ser Thr Ser Thr Gly Asp Thr Leu Leu Thr Gln
        355                 360                 365

TCT CTG CTG ATG GAG CTT TCC GCA CTG TGT CGG GTG GAG GTG GAA GAA  1152
Ser Leu Leu Met Glu Leu Ser Ala Leu Cys Arg Val Glu Val Glu Glu
    370                 375                 380

GGT CTG GCG CTG GTC GCG TTG ATT GGC AAT GAC CTG TCA AAA GCC TGC  1200
Gly Leu Ala Leu Val Ala Leu Ile Gly Asn Asp Leu Ser Lys Ala Cys
385                 390                 395                 400

GCC GTT GGC AAA GAG GTA TTC GGC GTA CTG GAA CCG TTC AAC ATT CGC  1248
Ala Val Gly Lys Glu Val Phe Gly Val Leu Glu Pro Phe Asn Ile Arg
                405                 410                 415

ATG ATT TGT TAT GGC GCA TCC AGC CAT AAC CTG TGC TTC CTG GTG CCC  1296
Met Ile Cys Tyr Gly Ala Ser Ser His Asn Leu Cys Phe Leu Val Pro
            420                 425                 430

GGC GAA GAT GCC GAG CAG GTG GTG CAA AAA CTG CAT AGT AAT TTG TTT  1344
Gly Glu Asp Ala Glu Gln Val Val Gln Lys Leu His Ser Asn Leu Phe
        435                 440                 445

GAG TAA                                                         1350
Glu  *
    450
```

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR:2:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIK:

(A) LÄNGE: 36 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG-CHARAKTER: einsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (Genom)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:2:

GATCCATGGC TGAAATTGTT GTCTCCAAAT TTGGCG 36

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR:3:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIK:

(A) LÄNGE: 36 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG-CHARAKTER: einsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (Genom)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:3:

GTACCGCCAA ATTTGGAGAC AACAATTTCA GCCATG 36

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR:4:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIK:

(A) LÄNGE: 48 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG-CHARAKTER: einsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (Genom)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:4:

CCCGGGCCAT GGCTACAGGT TTAACAGCTA AGACCGGAGT AGAGCACT 48

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR:5:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIK:

(A) LÄNGE: 37 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG-CHARAKTER: einsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (Genom)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:5:

GATATCGAAT TCTCATTATA GAACTCCAGC TTTTTTC 37

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR:6:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIK:

(A) LÄNGE: 917 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG-CHARAKTER: einsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (Genom)

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) ORT: 3.911

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:6:

```
CC ATG GCT ACA GGT TTA ACA GCT AAG ACC GGA GTA GAG CAC TTC GGC    47
   Met Ala Thr Gly Leu Thr Ala Lys Thr Gly Val Glu His Phe Gly
     1               5                  10                  15

ACC GTT GGA GTA GCA ATG GTT ACT CCA TTC ACG GAA TCC GGA GAC ATC   95
Thr Val Gly Val Ala Met Val Thr Pro Phe Thr Glu Ser Gly Asp Ile
                20                  25                  30

GAT ATC GCT GCT GGC CGC GAA GTC GCG GCT TAT TTG GTT GAT AAG GGC  143
Asp Ile Ala Ala Gly Arg Glu Val Ala Ala Tyr Leu Val Asp Lys Gly
            35                  40                  45

TTG GAT TCT TTG GTT CTC GCG GGC ACC ACT GGT GAA TCC CCA ACG ACA  191
Leu Asp Ser Leu Val Leu Ala Gly Thr Thr Gly Glu Ser Pro Thr Thr
        50                  55                  60
```

```
ACC GCC GCT GAA AAA CTA GAA CTG CTC AAG GCC GTT CGT GAG GAA GTT  239
Thr Ala Ala Glu Lys Leu Glu Leu Leu Lys Ala Val Arg Glu Glu Val
     65                  70                  75

GGG GAT CGG GCG AAG CTC ATC GCC GGT GTC GGA ACC AAC AAC ACG CGG  287
Gly Asp Arg Ala Lys Leu Ile Ala Gly Val Gly Thr Asn Asn Thr Arg
 80                  85                  90                  95

ACA TCT GTG GAA CTT GCG GAA GCT GCT GCT TCT GCT GGC GCA GAC GGC  335
Thr Ser Val Glu Leu Ala Glu Ala Ala Ala Ser Ala Gly Ala Asp Gly
                100                 105                 110

CTT TTA GTT GTA ACT CCT TAT TAC TCC AAG CCG AGC CAA GAG GGA TTG  383
Leu Leu Val Val Thr Pro Tyr Tyr Ser Lys Pro Ser Gln Glu Gly Leu
            115                 120                 125

CTG GCG CAC TTC GGT GCA ATT GCT GCA GCA ACA GAG GTT CCA ATT TGT  431
Leu Ala His Phe Gly Ala Ile Ala Ala Ala Thr Glu Val Pro Ile Cys
        130                 135                 140

CTC TAT GAC ATT CCT GGT CGG TCA GGT ATT CCA ATT GAG TCT GAT ACC  479
Leu Tyr Asp Ile Pro Gly Arg Ser Gly Ile Pro Ile Glu Ser Asp Thr
    145                 150                 155

ATG AGA CGC CTG AGT GAA TTA CCT ACG ATT TTG GCG GTC AAG GAC GCC  527
Met Arg Arg Leu Ser Glu Leu Pro Thr Ile Leu Ala Val Lys Asp Ala
160                 165                 170                 175

AAG GGT GAC CTC GTT GCA GCC ACG TCA TTG ATC AAA GAA ACG GGA CTT  575
Lys Gly Asp Leu Val Ala Ala Thr Ser Leu Ile Lys Glu Thr Gly Leu
                180                 185                 190

GCC TGG TAT TCA GGC GAT GAC CCA CTA AAC CTT GTT TGG CTT GCT TTG  623
Ala Trp Tyr Ser Gly Asp Asp Pro Leu Asn Leu Val Trp Leu Ala Leu
            195                 200                 205
```

```
GGC GGA TCA GGT TTC ATT TCC GTA ATT GGA CAT GCA GCC CCC ACA GCA  671
Gly Gly Ser Gly Phe Ile Ser Val Ile Gly His Ala Ala Pro Thr Ala
        210                 215                 220

TTA CGT GAG TTG TAC ACA AGC TTC GAG GAA GGC GAC CTC GTC CGT GCG  719
Leu Arg Glu Leu Tyr Thr Ser Phe Glu Glu Gly Asp Leu Val Arg Ala
    225                 230                 235

CGG GAA ATC AAC GCC AAA CTA TCA CCG CTG GTA GCT GCC CAA GGT CGC  767
Arg Glu Ile Asn Ala Lys Leu Ser Pro Leu Val Ala Ala Gln Gly Arg
240                 245                 250                 255

TTG GGT GGA GTC AGC TTG GCA AAA GCT GCT CTG CGT CTG CAG GGC ATC  815
Leu Gly Gly Val Ser Leu Ala Lys Ala Ala Leu Arg Leu Gln Gly Ile
                260                 265                 270

AAC GTA GGA GAT CCT CGA CTT CCA ATT ATG GCT CCA AAT GAG CAG GAA  863
Asn Val Gly Asp Pro Arg Leu Pro Ile Met Ala Pro Asn Glu Gln Glu
            275                 280                 285

CTT GAG GCT CTC CGA GAA GAC ATG AAA AAA GCT GGA GTT CTA TAA TGAGAATTC  918
Leu Glu Ala Leu Arg Glu Asp Met Lys Lys Ala Gly Val Leu  *
        290                 295                 300
```

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR:7:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIK:

(A) LÄNGE: 22 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG-CHARAKTER: einsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (Genom)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:7:

CTTCCCGTGA CCATGGGCCA TC 22

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR:8:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIK:

(A) LÄNGE: 75 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG-CHARAKTER: einsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (Genom)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:8:

CATGGCTGGC TTCCCCACGA GGAAGACCAA CAATGACATT

ACCTCCATTG CTAGCAACGG 60

TGGAAGAGTA CAATG 75

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR:9:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIK:

(A) LÄNGE: 75 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG-CHARAKTER: einsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (Genom)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:9:

CATGCATTGT ACTCTTCCAC CGTTGCTAGC AATGGAGGTA

ATGTCATTGT TGGTCTTCCT 60

CGTGGGGAAG CCAGC 75

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR:10:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIK:

(A) LÄNGE: 90 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG-CHARAKTER: einsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (Genom)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:10:

CATGGCTTCC TCAATGATCT CCTCCCCAGC TGTTACCACC

GTCAACCGTG CCGGTGCCGG 60

CATGGTTGCT CCATTCACCG GCCTCAAAAG 90

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR:11:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIK:

(A) LÄNGE: 90 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG-CHARAKTER: einsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (Genom)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:11:

CATGCTTTTG AGGCCGGTGA ATGGAGCAAC CATGCCGGCA

CCGGCACGGT TGACGGTGGT 60

AACAGCTGGG GAGGAGATCA TTGAGGAAGC 90

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR:12:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIK:

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG-CHARAKTER: einsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (Genom)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:12:

CCGGTTTGCT GTAATAGGTA CCA 23

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR:13:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIK:

(A) LÄNGE: 31 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG-CHARAKTER: einsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (Genom)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:13:

AGCTTGGTAC CTATTACAGC AAACCGGCAT G 31

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR:14:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIK:

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG-CHARAKTER: einsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (Genom)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:14:

GCTTCCTCAA TGATCTCCTC CCCAGCT 27

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR:15:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIK:

(A) LÄNGE: 28 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG-CHARAKTER: einsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (Genom)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:15:

CATTGTACTC TTCCACCGTT GCTAGCAA 28

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR:16:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIK:

(A) LÄNGE: 839 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG-CHARAKTER: einsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (Genom)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:16:

```
GGATCCCCCG GGCTGCAGGA ATTCTACGTA CCATATAGTA AGACTTTGTA TATAAGACGT   60

CACCTCTTAC GTGCATGGTT ATATGTGACA TGTGCAGTGA CGTTGTACCA TATAGTAAGA  120

CTTTGTATAT AAGACGTCAC CTCTTACGTG CATGGTTATA TGTGACATGT GCAGTGACGT  180

TAACCGCACC CTCCTTCCCG TCGTTTCCCA TCTCTTCCTC CTTTAGAGCT ACCACTATAT  240

AAATCAGGGC TCATTTTCTC GCTCCTCACA GGCTCATCAG CACCCCGGCA GTGCCACCCC  300

GACTCCCTGC ACCTGCCATG GGTACGCTAG CCCGGGAGAT CTGACAAAGC AGCATTAGTC  360

CGTTGATCGG TGGAAGACCA CTCGTCAGTG TTGAGTTGAA TGTTTGATCA ATAAAATACG  420

GCAATGCTGT AAGGGTTGTT TTTTATGCCA TTGATAATAC ACTGTACTGT TCAGTTGTTG  480

AACTCTATTT CTTAGCCATG CCAGTGCTTT TCTTATTTTG AATAACATTA CAGCAAAAAG  540

TTGAAAGACA AAAAAANNNN NCCCCGAACA GAGTGCTTTG GGTCCCAAGC TTCTTTAGAC  600

TGTGTTCGGC GTTCCCCCTA AATTTCTCCC CTATATCTCA CTCACTTGTC ACATCAGCGT  660

TCTCTTTCCC CTATATCTCC ACGCTCTACA GCAGTTCCAC CTATATCAAA CCTCTATACC  720

CCACCACAAC AATATTATAT ACTTTCATCT TCACCTAACT CATGTACCTT CCAATTTTTT  780

TCTACTAATA ATTATTTACG TGCACAGAAA CTTAGGCAAG GGAGAGAGAG AGCGGTACC   839
```

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR:17:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIK:

(A) LÄNGE: 43 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG-CHARAKTER: einsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (Genom)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:17:

CTAGAAGCCT CGGCAACGTC AGCAACGGCG GAAGAATCCG GTG 43

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR:18:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIK:

(A) LÄNGE: 43 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG-CHARAKTER: einsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (Genom)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:18:

CATGCACCGG ATTCTTCCGC CGTTGCTGAC GTTGCCGAGG CTT 43

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR:19:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIK:

(A) LÄNGE: 55 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG-CHARAKTER: einsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (Genom)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:19:

GATCCCATGG CGCCCCTTAA GTCCACCGCC AGCCTCCCCG TCGCCCGCCG CTCCT 55

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR:20:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIK:

(A) LÄNGE: 55 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG-CHARAKTER: einsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (Genom)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:20:

CTAGAGGAGC GGCGGGCGAC GGGGAGGCTG GCGGTGGACT

TAAGGGGCGC CATGG 55

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR:21:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIK:

(A) LÄNGE: 59 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG-CHARAKTER: einsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (Genom)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:21:

CATGGCGCCC ACCGTGATGA TGGCCTCGTC GGCCACCGCC

GTCGCTCCGT TCCAGGGGC 59

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR:22:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIK:

(A) LÄNGE: 59 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG-CHARAKTER: einsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (Genom)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:22:

TTAAGCCCCT GGAACGGAGC GACGGCGGTG GCCGACGAGG

CCATCATCAC GGTGGGCGC 59

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR:23:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIK:

(A) LÄNGE: 16 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG-CHARAKTER: einsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (Genom)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:23:

GCGCCCACCG TGATGA 16

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR:24:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIK:

(A) LÄNGE: 16 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANG-CHARAKTER: einsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (Genom)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:24:

CACCGGATTC TTCCGC 16

Patentansprüche

1. Ein chimäres Gen, umfassend ein isoliertes Nukleinsäurefragment, welches für eine Antisense-Lysin-Ketoglutarat-Reduktase ganz oder zum Teil codiert, wobei die Expression des chimären Gens die Expression der Ketoglutarat-Reduktase in Samen transformierter Pflanzen reduziert oder eliminiert.

2. Ein chimäres Gen nach Anspruch 1, worin das Nukleinsäurefragment in umgekehrter Orientierung mit

einer Samen-spezifischen Promotor-Sequenz verkettet ist.

3. Ein chimäres Gen wie in Anspruch 1 oder Anspruch 2 beansprucht, wobei das Gen ein isoliertes Nukleinsäurefragment umfasst, welches
(a) ein erstes Nukleinsäureunterfagment umfasst, das für Aspartokinase codiert, welche gegenüber Hemmung durch Lysin unempfindlich ist, und
(b) ein zweites Nukleinsäureunterfragment umfasst, das für Dihydrodipicolinsäure-Synthase codiert, welche mindestens 20fach weniger empfindlich gegenüber Hemmung durch Lysin ist als Pflanzen-DHDPS, und
(c) ein drittes Nukleinsäurefragment umfasst, welches für eine Lysin-Ketoglutarat-Reduktase ganz oder zum Teil codiert wie in Anspruch 1 definiert,
wobei das erste und das zweite Unterfragment beide jeweils wirksam verkettet sind mit einer geeigneten pflanzlichen Chloroplasten-Transit-Sequenz und mit einer geeigneten regulatorischen Sequenz, um Expression im Samen transformierter Pflanzen zu fördern, und das dritte Nukleinsäureunterfragment mit einer geeigneten regulatorischen Sequenz verkettet ist, um Expression der Antisense-RNS in Samen transformierter Pflanzen zu fördern.

4. Das chimäre Gen nach Anspruch 3, in welchem:
(a) das erste Nukleinsäureunterfragment eine Nukleotidsequenz umfasst, wie in SEQ ID NO: 1 gezeigt, welche für eine Lysin-unempfindliche Variante von E. coli AKIII codiert und weiterhin dadurch gekennzeichnet ist, dass mindestens eine der nachfolgenden Bedingungen zutrifft:
(1) Die Aminosäure an Position 318 ist eine andere Aminosäure als Methionin, oder
(2) die Aminosäure an Position 352 ist eine andere Aminosäure als Threonin; oder
(b) das zweite Nukleinsäureunterfragment von Bakterien stammt.

5. Eine Pflanze, welche in ihrem Genom das Nukleinsäurefragment nach einem der Ansprüche 1 bis 4 umfasst.

6. Samen, welche von der Pflanze nach Anspruch 5, die in ihrem Gen das Nukleinsäurefragment nach einem der Ansprüche 1 bis 4 umfasst, erhalten wurden.

7. Ein Verfahren zur Steigerung des Lysingehaltes der Pflanzensamen, umfassend:
(a) Transformieren der Pflanzenzellen mit dem Nukleinsäurefragment nach Anspruch 3;
(b) Aufziehen fertiler reifer Pflanzen aus den transformierten Pflanzenzellen, erhalten nach Schritt (a), unter geeigneten Bedingungen, um Samen zu erhalten; und
(c) Selektion solcher Samen vom Samen der Nachkommenschaft nach Schritt (b), welche erhöhte Spiegel an Lysin enthalten.

8. Eine Pflanze, produziert nach dem Verfahren von Anspruch 7 zur Steigerung des Lysin-Gehaltes der Pflanzensamen, wobei die Pflanze fähig ist zur Vererbung der Nukleinsäurefragmente an eine Pflanze der Nachkommenschaft und wobei die Pflanze der Nachkommenschaft die Fähigkeit hat, Spiegel von freiem Lysin zu produzieren, die mindestens zweimal höher sind als freie Lysin-Spiegel von Pflanzen, die nicht das Nukleinsäurefragment enthalten.

9. Ein Verfahren zur Bereitung einer transgenen Pflanze mit einem gesteigerten Lysingehalt in den Samen, umfassend die Transformation einer Pflanze mit dem Nukleinsäurefragment nach Anspruch 3.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG.1a

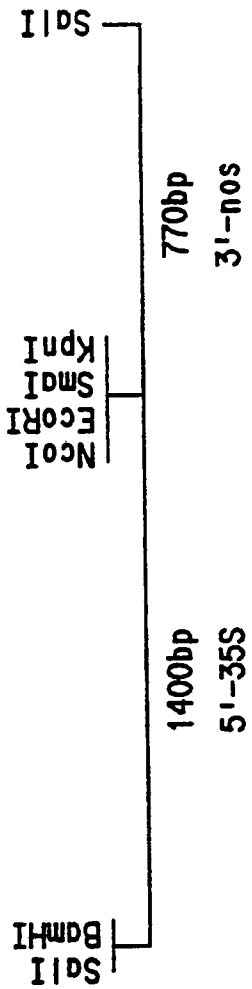


FIG.1b

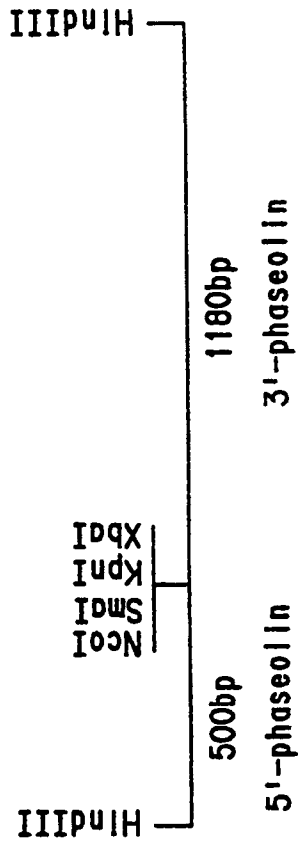
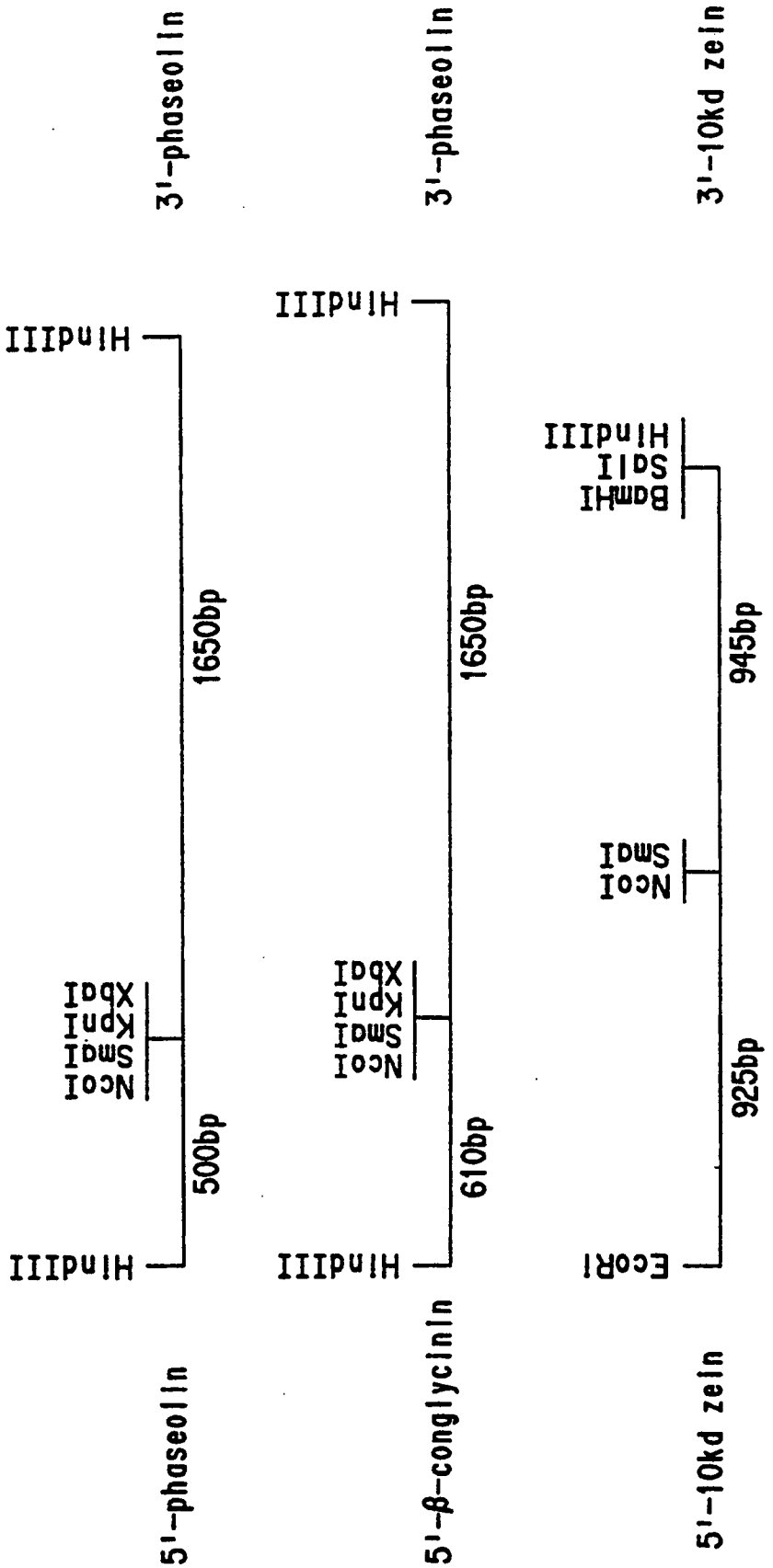


FIG.2


5'-phaseolin
HindIII
500bp
NcoI
SmaI
KpnI
XbaI
HindIII
3'-phaseolin
5'-β-conglycinin
HindIII
610bp
NcoI
SmaI
KpnI
XbaI
HindIII
3'-phaseolin
5'-10kd zein
EcoRI
925bp
NcoI
SmaI
BamHI
SalI
HindIII
945bp
3'-10kd zein

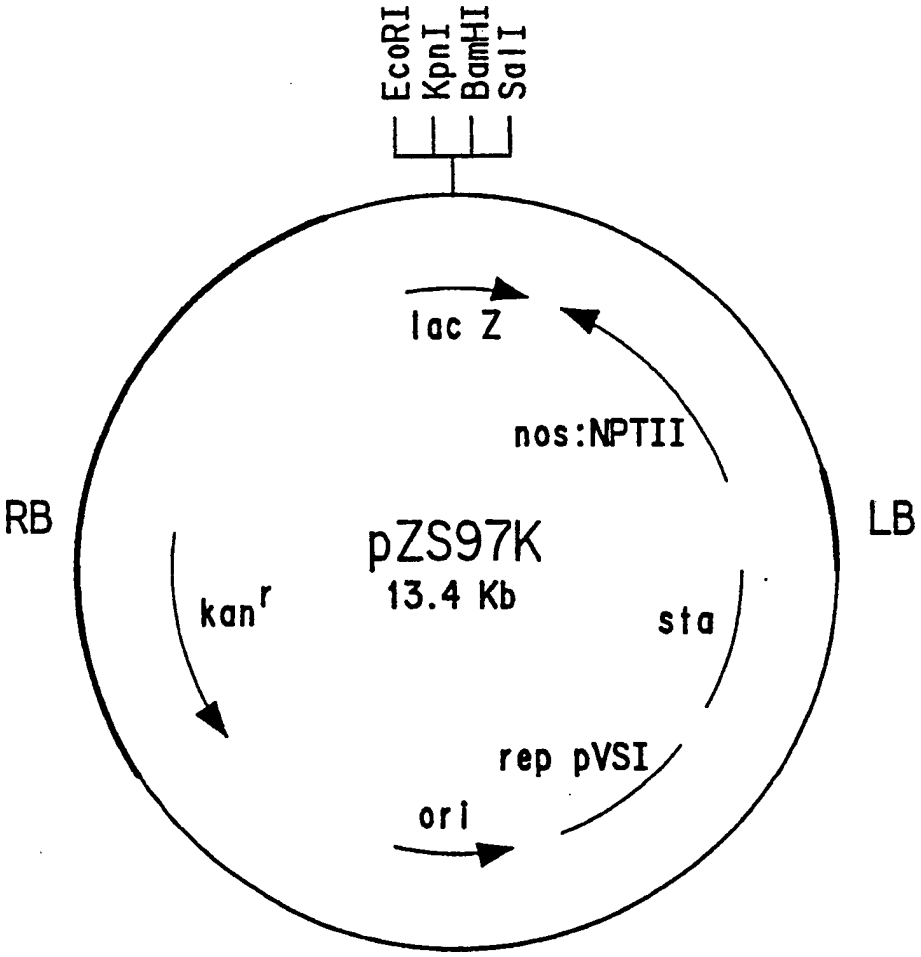

EcoRI
KpnI
BamHI
SalI
lac Z
nos:NPTII
RB
LB
pZS97K
13.4 Kb
kan^r
sta
rep pVSI
ori

FIG.4

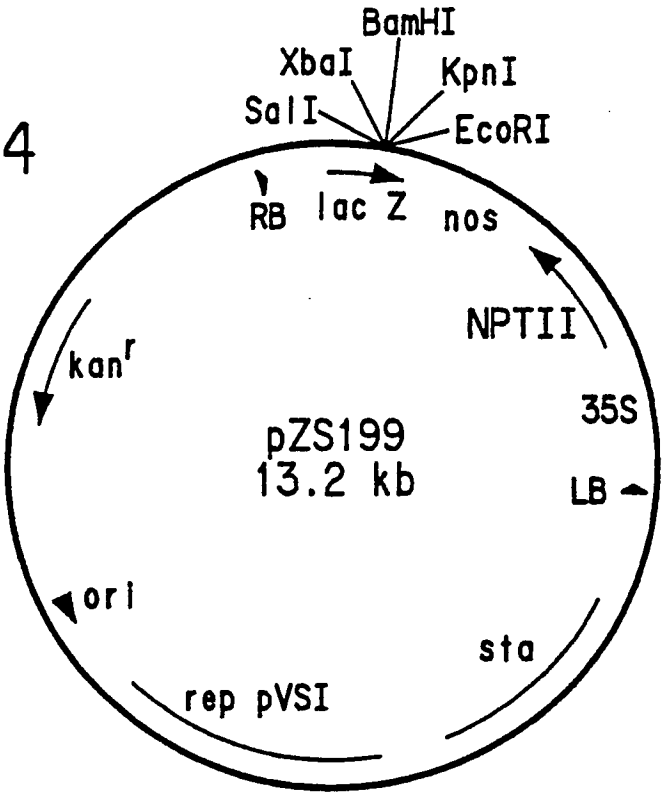
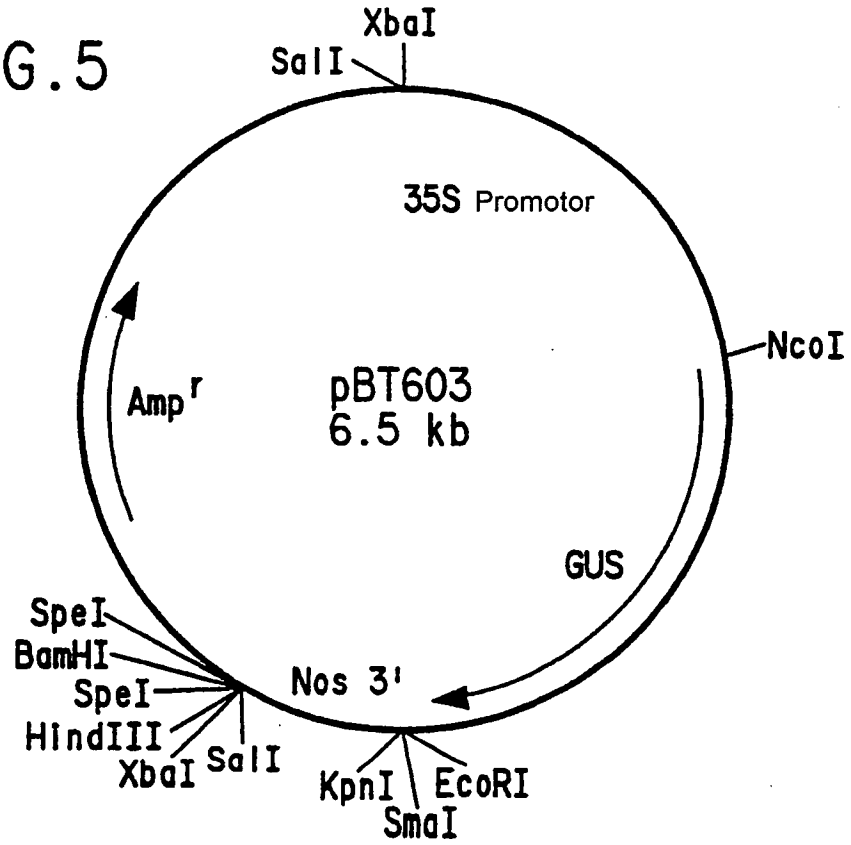

BamHI
XbaI
KpnI
SalI
EcoRI
RB
lac Z
nos
NPTII
kanr
35S
pZS199
13.2 kb
LB
ori
sta
rep pVSI

FIG.5


XbaI
SalI
35S Promotor
NcoI
Ampr
pBT603
6.5 kb
GUS
SpeI
BamHI
SpeI
HindIII
XbaI
SalI
Nos 3'
KpnI
EcoRI
SmaI