



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 32 403 T2** 2005.05.19

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 846 167 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 32 403.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US96/12671**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 926 872.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 97/006250**

(86) PCT-Anmeldetag: **01.08.1996**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **20.02.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **10.06.1998**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **06.05.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **19.05.2005**

(51) Int Cl.⁷: **C12N 15/00**

**C12N 15/09, C12N 15/11, C12N 15/29,
C12N 15/63, C12N 15/65, C12N 15/82,
C12N 15/90, A01H 1/00, A01H 1/04**

(30) Unionspriorität:

2136 10.08.1995 US

(73) Patentinhaber:

Rutgers University, Piscataway, N.J., US

(74) Vertreter:

LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**MALIGA, Pal, East Brunswick, US; ALLISON, Lori
A., Lincoln, US; HAJDUKIEWICZ, Peter T.,
Somerset, US**

(54) Bezeichnung: **ZELLKERN-CODIERTES TRANSKRIPTIONSSYSTEM PLASTIDEN HÖHERER PFLANZEN**

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

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Pflanzengentechnik und insbesondere die Plastidetransformation in höheren Pflanzen. Die Erfindung stellt neue Promotorsequenzen bereit, die für die Expression fremder Gene von Interesse in verschiedenen Pflanzenspezies zweckdienlich sind.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Chloroplastengene werden von einer RNA-Polymerase transkribiert, die Plastide-kodierte Untereinheiten enthält, die zu den α -, β - und β' -Untereinheiten der E.-coli-RNA-Polymerase homolog sind. Die von diesem Enzym genutzten Promotoren sind den σ^{70} -Promotoren von E. coli ähnlich und bestehen aus -35- und -10-Konsenselementen (G. L. Igloi und N. Kossel, Crit. Rev. Plant Sci. 10, 525 (1992); W. Gruissem und J. C. Tonkyn, Crit. Rev. Plant Sci. 12, -19 (1993)). Die Promotorauswahl durch die Plastide-kodierte RNA-Polymerase hängt von Kern-kodierten Sigma-artigen Faktoren ab (Link et al., Plant promoters and transcription factors, Springer Verlag, Heidelberg, S. 63-83 (1994)). Außerdem wird die Transkriptionsaktivität aus einigen Promotoren durch Kern-kodierte Transkriptionsfaktoren moduliert, die mit Elementen stromauf des Core-Promotors wechselwirken (L. A. Allison und P. Maliga, EMBO J. 14, 3721-3730; R. Iratni, L. Baeza, A. Andreeva, R. Mache, S. Lerbs-Mache, Genes Dev. 8, 2928 (1994)). Diese Faktoren vermitteln die Kernkontrolle der Plastidengenexpression als Reaktion auf entwicklungs- und milieubedingte Signale.

[0003] Es sind Vermutungen über die Existenz eines zweiten Transkriptionssystems in Plastiden angestellt worden. Jedoch ist ein direkter Beweis zur Unterstützung einer solchen Vermutung vordem nicht erbracht worden. Die Identifizierung eines neuen, zweiten Transkriptionssystems in Plastiden stellt einen signifikanten Fortschritt auf dem Gebiet der Pflanzengentechnik dar. Ein solches System ermöglicht höhere Flexibilität und Auswahl an für die Plastidetransformation verfügbaren Pflanzenspezies und erleichtert die gewebespezifische Expression fremder Proteine und RNAs über Konstrukte, die durch DNA-Rekombinationstechniken manipuliert werden können.

Zusammenfassung der Erfindung

[0004] Diese Erfindung stellt DNA-Konstrukte und Verfahren zum stabilen Transformieren von Plastiden von mehrzelligen Pflanzen bereit. Die DNA-Konstrukte der Erfindung erweitern die Auswahl an Pflanzenspezies, die transformiert werden können, und erleichtern die gewebespezifische Expression fremder Gene von Interesse.

[0005] Nach einem Aspekt der Erfindung werden DNA-Konstrukte bereitgestellt, die neue Promotorsequenzen enthalten, die von einer Kern-kodierten Plastide- (NEP-, Nuclear-Encoded-Plastid-) RNA-Polymerase erkannt werden. Das DNA-Konstrukt enthält eine transformierende DNA, umfassend ein Targeting-Segment, zumindest eine zur Insertion von zumindest einem fremden Gen von Interesse adaptierte Klonierungsstelle, wobei die Expression des fremden Gens von Interesse durch einen von einer NEP-Polymerase erkannten Promotor reguliert wird, und ein Plastide-selektierbares Markergen.

[0006] Die Verwendung von Promotorelementen, die von einer Plastide-kodierten Plastide- (PEP-, Plastid-Encoded-Plastid-) RNA-Polymerase erkannt werden, zur Verstärkung der Expression fremder Gene von Interesse ist ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung. Wie die oben beschriebenen Konstrukte enthalten diese Konstrukte ebenfalls ein Targeting-Segment und eine Klonierungsstelle zur Expression eines fremden Gens von Interesse.

[0007] Die von der Plastide-kodierten Plastide-RNA-Polymerase erkannten Promotoren sind in photosynthetischen Geweben, wie z. B. im Blatt, gründlich charakterisiert worden. Im Gegensatz dazu steuert das Kern-kodierte Polymerase-Transkriptionssystem der vorliegenden Erfindung die Expression von Plastidengen auch in Wurzeln, Samen und Meristemgewebe. In den meisten Pflanzen, einschließlich Mais, Baumwolle und Weizen, wird die Pflanzenregeneration über somatische Embryogenese (d. h. Meristemgewebe umfassend) erzielt. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die effiziente Plastidetransformation in diesen Feldfrüchten stark vereinfacht, und zwar über die Verwendung des NEP-Plastidetranskriptionssystems, der Promotoren und Polymerasen der vorliegenden Erfindung.

[0008] Die NEP-Promotoren der Erfindung werden in gegenwärtig verfügbare Plastidetransformationsvektoren

ren und Protokolle für deren Verwendung inkorporiert, wie z. B. jene, die in den US-Patenten Nr. 5.451.513 und 5.877.402 beschrieben sind und auch von Svab und Maliga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 913 (1993), beschrieben werden. Um transgene Pflanzen zu erhalten, werden Plastiden nicht-photosynthetischer Gewebe mit selektierbaren Markergenen transformiert, die aus NEP-Promotoren exprimiert und von der Kern-kodierten Polymerase transkribiert werden. Desgleichen werden zur Expression von Proteinen von Interesse Expressionskassetten für die starke Expression in nicht-photosynthetischen Geweben konstruiert, und zwar unter Verwendung des aus der Kern-kodierten Polymerase transkribierten NEP-Promotors. In einem weiteren Aspekt der Erfindung werden PEP-Promotoren der Erfindung in gegenwärtig verfügbare Plastidetransformationsvektoren und Protokolle zu deren Verwendung inkorporiert.

[0009] In noch einem weiteren Aspekt der Erfindung kann das NEP-Transkriptionssystem auch mit dem σ^{70} -Typ-System über die Verwendung von NEP-PEP-Doppel-Promotoren kombiniert werden.

Kurzbeschreibung der Abbildungen

[0010] Fig. 1. Deletion von *rpoB* aus dem Tabak-Plastidengenom durch gezielten Gensatz. (A) Die homologe Rekombination (diagonale Linien) über Plastide-DNA-Sequenzen, die *aadA* im Plasmid pLAA57 flankieren, resultiert im Ersatz von *rpoB* (Sac-I- → Sma-I-Fragment) im Plastidengenom der Wildform (ptDNA) durch *aadA*-Sequenzen, was das $\Delta rpoB$ -Plastidengenom ($\Delta rpoB$ -ptDNA) liefert. Abkürzungen: *rpoB*, *rpoC1*, *rpoC2* sind Plastidegene, die für die β -, β' - und β'' -Untereinheiten der E.-coli-artigen RNA-Polymerase kodieren; *aadA* ist ein chimäres Spectinomycin-Resistenzgen. Restriktionsenzymkennungsstellen: P, PstI, Sm, SmaI; Sc, SacI. (B) Pigmentmangel ist mit der Deletion von *rpoB* assoziiert. Zelluläre Gesamt-DNA wurde aus grünem (Bahnen 1, 3, 5) und weißem (Bahnen 2, 4, 6) Blattgewebe aus drei unabhängig transformierten Linien (Linie Nt-pLAA57-11B, Bahnen 1 und 2; Linie Nt-pLAA57-16B, Bahnen 3 und 4; Linie Nt-pLAA57-18C, Bahnen 5 und 6) und aus grünem Blattgewebe der Wildform (Nt, Bahn 7) isoliert. Die DNA wurde mit Pst 1 verdaut, und der Gelblot wurde mit einem DNA-Fragment (Nucleotidpositionen 22.883–24.486 der ptDNA, Nummerierung gemäß K. Shinozaki et al., EMBO J. 5, 2043 (1986)) hybridisiert, das einen Abschnitt von *rpoC1* enthielt (starke schwarze Linie in Fig. 1A). Die Sonde hybridisiert an ein 9,0-kb-Fragment aus dem Genom der Wildform und an ein 4,2-kb-Fragment aus der $\Delta rpoB$ -ptDNA. (C) Die DNA-Gelblot-Analyse bestätigt das Fehlen von ptDNA-Kopien der Wildform in weißen Sprösslingen der Linie Nt-pLAA57-10A (Bahn 2) und in der weißen Samennachkommenschaft einer gepfropften Pflanze derselben Linie (Bahn 3). DNA aus grünem Blattgewebe der Wildform wurde auf Bahn 1 aufgegeben. Man beachte das Fehlen des 9,0-kb-Fragments der ptDNA der Wildform in $\Delta rpoB$ -Pflanzen. Der Blot wurde wie für Fig. 1B hergestellt.

[0011] Fig. 2. Deletion von *rpoB* resultiert in einem pigmentarmen Phänotyp. (A) Grüne Pflanzen der Wildform (links), pigmentarme $\Delta rpoB$ - (rechts) und chimäre (Mitte) Pflanzen sind dargestellt. (B) Blühende chimäre Pflanze im Gewächshaus. Man beachte die weißen Blattränder, die $\Delta rpoB$ -Plastiden in der zweiten Blattschicht anzeigen, welche die Keimbahnzellen bildet.

[0012] Fig. 3. (A) Plastiden (P) in Blatt-Mesophyllzellen von $\Delta rpoB$ -Pflanzen, denen organisierte photosynthetische Membranen fehlen. Abkürzungen: N, Kern; V, Vesikeln, M, Mitochondrium. (B) Zum Vergleich ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Blatt-Chloroplasten der Wildform (Cp) mit Thylakoidmembranen (T) gezeigt. Die Vergrößerung in (A) sowie (B) beträgt 7.800X.

[0013] Fig. 4. (Oben) Ansammlung von Plastide-mRNAs für (A) photosynthetische Gene und (B) Gene des genetischen Systems in den $\Delta rpoB$ -Pflanzen. Gelblots wurden mit zellulärer Gesamt-RNA (A, 3 μ g pro Bahn; B, 5 μ g pro Bahn) aus Wildform- (Bahnen 1, 3, 5) und $\Delta rpoB$ - (Bahnen 2, 4, 6) Blattgewebe hergestellt und hybridisierten an die bezeichneten Plastidengensequenzen. (Unten) Die oben gezeigten Blots wurden mit 25S-rDNA-Sequenzen erneut sondiert. Hybridisierungssignale wurden mit einem Molecular-Dynamics-Phosphorimager quantifiziert und gegen das 25S-rRNA-Signal normiert. Das Vielfache der Signalintensitäten der Wildform gegenüber $\Delta rpoB$ für jede Sonde ist unter den Bahnen dargestellt.

[0014] Fig. 5. Die Transkription in den $\Delta rpoB$ -Pflanzen beginnt aus einem nicht-kanonischen Promotor. (A) Primerextensionsanalyse wurde verwendet, um die 5'-Enden von *rbcL*- und 16S-rDNA-Transkripten in den Wildform- (Bahnen 1, 3) und $\Delta rpoB$ - (Bahnen 2, 4) Pflanzen zu kartieren. Primäre Transkripte sind durch Kreise markiert (offen für die Wildform, geschlossen für $\Delta rpoB$), prozessierte Transkripte durch ein Dreieck. Transkripte unbekannten Ursprungs sind durch Sterne markiert. Die begleitenden Sequenzleitern (Beladungsreihenfolge GATC) wurden unter Verwendung derselben Primer erzeugt, die in den Primerextensionsreaktionen verwendet wurden. Die Zahlen neben jedem Extensionsprodukt markieren den Abstand vom ersten Nucleotid der kodierenden Sequenz für *rbcL* und vom ersten Nucleotid der reifen 16S-rRNA. (B) Kartierung von primären

Transkripten für 16S-rRNA in den Wildform- (Bahn 2) und Δ poB- (Bahn 3) Pflanzen. Blatt-Gesamt-RNA (20 μ g) wurde in vitro gecappt, und gecappte 16S-rRNA-Spezies wurden mittels RNase-Schutz nach Hybridisieren mit einer komplementären RNA-Sonde identifiziert. Gecappte geschützte Produkte sind wie in (A) gekennzeichnet. Bahn 1 enthält RNA-Standards der bezeichneten Größen. (C) DNA-Sequenz der 16SrDNA-Stromaufregion mit Transkripten, die aus Promotoren für die Plastide-kodierten (σ^{70} -Typ, P1) und Kern-kodierten (P2) Polymerasen (die Bezeichnung P1 und P2 basiert auf A. Vera und M. Sugiura, Curr. Genet. 27, 280 (1995)) initiieren. Consensus- σ^{70} -Promotorelemente (–35 und –10) sind eingerahmt. Initiationsstellen sind wie in (A) und (B) durch Kreise markiert. Die Nummerierung beginnt vom ersten Nucleotid stromauf der kodierenden 16SrDNA-Region (–1 = Nucleotid 102.757 im Tabak-Plastidengenom).

[0015] Fig. 6. Anreicherung von Plastide-mRNAs in Wildform- und Δ poB-Tabakblättern. Die Blots für die Plastidegene (siehe Beispiel 1) sind wie folgt gruppiert: (A) mRNA ist in den Blättern von Pflanzen der Wildform reichlicher vorhanden als in Δ poB-Pflanzen. (B) Die Mengen an mRNA sind in Wildform- und Δ poB-Blättern vergleichbar oder sind (C) in Δ poB-Blättern höher. Gelblots wurden mit zellulärer Gesamt-RNA (3 μ g pro Bahn) aus Wildform- (Bahn 1) und Δ poB- (Bahn 2) Blattgewebe hergestellt und an die bezeichneten Plastidegenesequenzen hybridisiert. (Untere Tafel) Um die Beladung zu überprüfen, wurden die oben gezeigten Blots erneut mit 25S-rDNA-Sequenzen sondiert.

[0016] Fig. 7. Kartierung von atpB-Transkriptionsinitiationsstellen in Wildform- und Δ poB-Tabakblättern. (A) Primerextensionsanalyse. Enden-markierte Primerextensionsprodukte aus Wildform- (wt-) und Δ poB- (T57-) Proben wurden entlang der durch Verwendung desselben Primers erhaltenen homologen Sequenz laufen gelassen. Die Zahlen entlang der Sequenz beziehen sich auf den Abstand vom ATG-Translationsinitiationscodon. Primäre Transkripte aus NEP- und PEP-Promotoren sind durch volle bzw. offene Kreise markiert. (B) In-vitro-Capping- und RNase-Schutz-Test zur Identifizierung primärer Transkript-5'-Enden. Bahnen wurden mit Δ poB- (T57; 1, 2) und Wildform- (wt; 4, 5) RNA-Proben mit (2, 4) und ohne (1, 5) schützender komplementärer Antisense-RNA beladen. Molekulargewichts- (MW-) Marker (100, 200, 300, 400 und 500 Nucleotide) wurden in Bahn 3 aufgegeben. Das Transkript-5'-Ende in (A) entspricht der Größe des geschützten Fragments in Klammern: –254 (277 nt), –289 (311). Man beachte das Artefakt etwas unter dem 200-nt-Marker, der in den ungeschützten RNA-Proben vorhanden ist. (C) Physikalische Karte der atpB-rbcl-Intergen-Region. Die Kartenposition der primären Transkript-5'-Enden für die atpB-NEP- und -PEP-Promotoren sind wie in (A) gekennzeichnet.

[0017] Fig. 8. Kartierung der atpI-Transkriptionsinitiationsstellen in Wildform- und Δ poB-Tabakblättern. (A) Primerextensionsanalyse. Enden-markierte Primerextensionsprodukte der Wildform- (wt-) und Δ poB- (T57-) Proben wurden entlang der durch Verwendung desselben Primers erhaltenen homologen Sequenz laufen gelassen. Die Zahlen entlang der Sequenz beziehen sich auf den Abstand vom ATG-Translationsinitiationscodon. Primäre Transkripte aus NEP- und PEP-Promotoren sind durch volle bzw. offene Kreise bezeichnet. (B) In-vitro-Capping- und RNase-Schutz-Test zur Identifizierung primärer Transkript-5'-Enden. Die Bahnen wurden mit Δ poB- (T57; 1, 2) und Wildform- (wt; 4, 5) RNA-Proben mit (2, 4) und ohne (1, 5) schützender komplementärer Antisense-RNA beladen. Molekulargewichts- (MW-) Marker (100, 200, 300, 400 und 500 Nucleotide) wurden in Bahn 3 aufgetragen. Das Transkript-5'-Ende in (A) entspricht der Größe des geschützten Fragments in Klammern: –130 (235 nt), –207, 209, 212 (303, 305, 309; nicht aufgelöst). Man beachte das Artefakt etwas unter dem 200-nt-Marker, der in den ungeschützten RNA-Proben vorhanden ist. (C) Physikalische Karte der rps2-atpI-Intergen-Region. Die Kartenposition der primären Transkript-5'-Enden für die atpI-NEP- und -PEP-Promotoren sind wie in (A) gekennzeichnet.

[0018] Fig. 9. Kartierung von clpP-Transkriptionsinitiationsstellen in Wildform- und Δ poB-Tabakblättern. (A) Primerextensionsanalyse. Enden-markierte Primerextensionsprodukte der Wildform- (wt-) und Δ poB- (T57-) Proben wurden entlang der durch Verwendung desselben Primers erhaltenen homologen Sequenz laufen gelassen. Die Zahlen entlang der Sequenz beziehen sich auf den Abstand vom ATG-Translationsinitiationscodon. Primäre Transkripte aus NEP- und PEP-Promotoren sind durch volle bzw. offene Kreise bezeichnet. (B) In-vitro-Capping- und RNase-Schutz-Test zur Identifizierung primärer Transkript-5'-Enden. Die Bahnen wurden mit Δ poB- (T57; 1, 2) und Wildform- (wt; 4, 5) RNA-Proben mit (2, 4) und ohne (1, 5) schützender komplementärer Antisense-RNA beladen. Molekulargewichts- (MW-) Marker (100, 200, 300, 400 und 500 Nucleotide) wurden in Bahn 3 aufgetragen. Das Transkript-5'-Ende in (A) entspricht der Größe des geschützten Fragments in Klammern: –53 (96 nt), –95 (138 nt), –173 (216 nt) und –511 (69 nt). Man beachte das Artefakt etwas unter dem 200-nt-Marker, der in den ungeschützten RNA-Proben vorhanden ist. (C) Physikalische Karte der clpP-psbB-Intergen-Region. Die Kartenposition der primären Transkript-5'-Enden für die clpP-NEP- und -PEP-Promotoren sind wie in (A) gekennzeichnet.

[0019] Fig. 10. Kartierung von accD-Transkriptionsinitiationsstellen in Wildform- und Δ rpoB-Tabakblättern. (A) Primerextensionsanalyse. Enden-markierte Primerextensionsprodukte der Wildform- (wt-) und Δ rpoB- (T57-) Proben wurden entlang der durch Verwendung desselben Primers erhaltenen homologen Sequenz laufen gelassen. Die Zahlen entlang der Sequenz beziehen sich auf den Abstand vom ATG-Translationsinitiationscodon. Das primäre Transkript für den PaccD-129-NEP-Promotor ist durch einen vollen Kreis bezeichnet. (B) In-vitro-Capping- und RNase-Schutz-Test zur Identifizierung primärer Transkript-5'-Enden. Die Bahnen wurden mit Δ rpoB- (T57; 1, 2) und Wildform- (wt; 4, 5) RNA-Proben mit (2, 4) und ohne (1, 5) schützender komplementärer Antisense-RNA beladen. Molekulargewichts- (MW-) Marker (100, 200, 300, 400 und 500 Nucleotide) wurden in Bahn 3 aufgetragen. Das -57-Transkript-5'-Ende in (A) entspricht dem geschützten 103-nt-Fragment. Man beachte das Artefakt etwas unter dem 200-nt-Marker, der in den ungeschützten RNA-Proben vorhanden ist. (C) Physikalische Karte der accD-rbcL-Intergen-Region. Die Kartenposition des primären Transkript-5'-Endes für den PaccD-129-NEP-Promotor ist gekennzeichnet.

[0020] Fig. 11. Vergleichende Anordnung von DNA-Sequenzen, welche die NEP-Promotor-Transkriptionsinitiationsstellen flankieren. Nucleotide mit mehr als 6 Übereinstimmungen sind eingerahmt. Die der Transkriptionsinitiationsstelle benachbarte Konsensussequenz ist darunter dargestellt. Die Positionen von 5'-Enden sind durch volle Kreise markiert. Man beachte, dass die 5'-Enden für Prps16-152 und Prps16-107 nicht gecappt wurden und möglicherweise keine primären Transkripte sind.

[0021] Fig. 12. NEP- und PEP-Polymerasen stellen über die Erkennung unterschiedlicher Promotoren einen Mechanismus für die selektive Transkription von Plastidegenen bereit. Man beachte, dass manche Gene nur PEP-Promotoren aufweisen (Photosystem I und Photosystem II) und andere PEP- sowie NEP-Promotoren (die meisten Haushaltsgene) oder nur NEP-Promotoren (accD) aufweisen.

[0022] Fig. 13. Ein schematisches Diagramm eines aus einem NEP-Promotor exprimierten chimären Plastidegens.

Beschreibung der Erfindung

[0023] Mehrere Berichte haben die Existenz einer weiteren Plastide-lokalisierten, Kern-kodierten RNA-Polymerase nahe gelegt (im Überblick behandelt in Grissem und Tonkyn (1993); Igloi und Kossel (1992); Mullet (1993); Link (1994)) – durch Deletieren des für die essentielle β -Untereinheit der E.-coli-ähnlichen Tabak-RNA-Polymerase kodierenden rpoB-Gens. Die Existenz eines zweiten Plastide-Transkriptionssystems, das vom Kern kodiert wird, ist nachgewiesen worden (Allison et al., EMBO J. 15, 2802–2809 (1996)). Die Deletion von rpoB lieferte photosynthetisch defekte pigmentarme Pflanzen. Eine Untersuchung der Plastide-Ultrastruktur in Blattmesophyllzellen der Δ rpoB-Pflanzen offenbarte Proplastide-artige Organellen, denen die gestapelten Thylakoidmembrananordnungen fehlten, die für photosynthetisch aktive Chloroplasten charakteristisch sind. Transkripte für die photosynthetischen rbcL-, psbA- und psbD-Gene waren niedrig, wogegen sich mRNAs für die rpl16-, atpI- und 16SrDNA-Gene auf das Ausmaß der Wildform oder darüber anreicherten. Das Fehlen der Transkriptanreicherung für die photosynthetischen Gene war auf das Fehlen von σ^{70} -Typ-Promotoraktivität zurückzuführen. Während in Tabakblättern der Wildform das ribosomale RNA-Operon normalerweise aus einem σ^{70} -Typ-Promotor transkribiert wird, wurde in den Δ rpoB-Pflanzen das rRNA-Operon aus einem Nicht- σ^{70} -Promotor transkribiert. Das rRNA-Operon ist die erste Transkriptionseinheit, für die sowohl eine Plastide-kodierte als auch eine Kern-kodierte Plastide-RNA-Polymerase (PEP bzw. NEP) identifiziert wurde.

[0024] Eine Analyse der Promotorregionen anderer Gene hat offenbart, dass das rRNA-Operon nicht einzigartig ist. Es ist ein Element einer großen Klasse von Plastidegenen, die zumindest je einen Promotor für PEP und NEP mit einer Möglichkeit zur Expression durch eine der beiden Plastide-RNA-Polymerasen aufweisen. Außerdem sind Plastidegene identifiziert worden, die ausschließlich durch NEP transkribiert werden. Darüber hinaus legen die Daten nahe, dass zusätzliche genspezifische Mechanismen die NEP-Transkript-Mengen in verschiedenen Plastide-Typen regulieren.

[0025] Eine NEP-Transkriptionsstartstelle ist ungefähr 62 Basen stromauf des reifen 16SrRNA-Terminus identifiziert worden. Die die Initiationsstelle umgebende Sequenz ist unter zahlreichen untersuchten Pflanzenspezies höchst konservativ und zeigt keine Ähnlichkeit mit der PEP-Promotorconsensussequenz. Für die Erkennung und Bindung der Kern-kodierten Polymerase wichtige NEP-Promotorconsensussequenzen (analog zu den -10- und -35-Sequenzen der E.-coli-artigen Transkriptionsinitiationsstelle) sind bevorzugt innerhalb von ungefähr 50 Nucleotiden in beiden Richtungen der NEP-Transkriptionsstartstelle lokalisiert. Wie in Beispiel 1 ausführlicher beschrieben wird, existieren mehrere verschiedene NEP-Promotoren, und NEP-Promotoren finden sich manchmal in Verbindung mit PEP-Promotoren.

[0026] Die Polymerasen der Erfindung können mittels Chromatographie unter Verwendung von Standardverfahren gereinigt werden. Die NEP-Polymeraseaktivität in Säulenfraktionen kann unter Einsatz von DNA-Segmenten, die NEP-Promotorregion umfassen, als Template in In-vitro-Transkriptionsreaktionen gemessen werden. Alternativ dazu können NEP-Promotorsegmente an eine Matrix gebunden werden, die durch irgendein Mittel abtrennbar ist (z. B. magnetische Perlen). Die matrixgebundene DNA wird mit einem Pflanzenextrakt unter Bedingungen inkubiert, bei denen die Bindung der Kern-kodierten Polymerase an DNA erwartet wird. Der Matrix/DNA/Polymerasekomplex wird dann vom Pflanzenextrakt abgetrennt, und das gebundene Protein kann dann isoliert und charakterisiert werden. Das mit einem der oben erwähnten Verfahren gereinigte Protein kann verwendet werden, um Antikörper zu produzieren, um Expressionsbibliotheken zu sondieren, und zwar zum Zwecke des Isolierens der Kerngene oder cDNAs, die für die Kern-kodierte Polymerase kodieren.

[0027] Als ein alternativer Ansatz für die Isolierung der NEP-Polymerase können Proteine mit spezifischer Affinität für das Promotorfragment isoliert werden, und es kann die N-terminale Aminosäuresequenz mittels Mikrosequenzierung bestimmt werden. Die Aminosäuresequenz kann dann verwendet werden, um geeignete PCR-Primer für die Genisolierung zu konstruieren.

[0028] Die Aktivität des bisher bekannten Plastide-kodierten σ^{70} -Typ-Transkriptionssystems ist in photosynthetisch aktiven Geweben, wie z. B. im Blatt, gut charakterisiert worden. Im Gegensatz dazu steuert das Kern-kodierte Polymerasetranskriptionssystem der vorliegenden Erfindung die Expression von Plastidegenen auch in Wurzeln, Samen und Meristemgewebe. In den meisten Pflanzen, einschließlich Mais, Baumwolle und Weizen, wird die Pflanzenregeneration über somatische Embryogenese (d. h. Meristemgewebe umfassend) erzielt. Die effiziente Plastidettransformation wird in diesen Feldfrüchten durch die Verwendung des NEP-Plastidettranskriptionssystems der vorliegenden Erfindung ermöglicht oder wesentlich erleichtert.

[0029] Die NEP-Promotoren der Erfindung können in gegenwärtig verfügbare Plastidettransaktionsvektoren und Protokolle ihrer Verwendung inkorporiert werden, wie z. B. jene, die in den US-Patenten Nr. 5.451.513 und 5.877.402 beschrieben sind und auch von Svab und Maliga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 913 (1993), beschrieben werden. Um transgene Pflanzen zu erhalten, werden Plastiden nicht-photosynthetischer Gewebe mit selektierbaren Markergenen transformiert, die aus NEP-Promotoren exprimiert und von der Kern-kodierten Polymerase transkribiert werden. Desgleichen werden zur Expression von Proteinen von Interesse Expressionskassetten für die starke Expression in nicht-photosynthetischen Geweben konstruiert, und zwar unter Verwendung des aus der Kern-kodierten Polymerase transkribierten NEP-Promotors. Das NEP-Transkriptionssystem kann auch mit dem σ^{70} -Typ-System über die Verwendung von NEP-PEP-Doppel-Promotoren kombiniert werden. In manchen Fällen kann auch die Expression von Transgenen aus NEP-Promotoren in photosynthetischem Gewebe wünschenswert sein.

[0030] Die in den untenstehenden Beispielen I-III dargelegte ausführliche Beschreibung beschreibt bevorzugte Verfahren zum Herstellen und Verwenden der DNA-Konstrukte der vorliegenden Erfindung und zur praktischen Umsetzung der Verfahren der Erfindung. Alle molekularen Klonierungs- und DNA-Rekombinationstechniken, die nicht speziell beschrieben sind, werden mittels Standardverfahren durchgeführt, wie sie z. B. in Ausubel (Hrsg.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc. (1994), allgemein dargelegt sind.

[0031] Die folgenden nicht einschränkenden Beispiele beschreiben die Erfindung ausführlicher.

Beispiel 1

Nachweis eines zweiten eigenständigen Plastide-Transkriptionssystems durch Deletion von rpoB

[0032] Um die Existenz einer Nicht-E.-coli-artigen RNA-Polymerase in Plastiden nachzuweisen, wurde das Gen für eine der essentiellen Untereinheiten des E.-coli-artigen Enzyms aus dem Tabak-Plastidengenom deletiert. mRNA-Mengen wurden daraufhin in den mutierten Plastiden festgestellt. Die Daten weisen darauf hin, dass bei Abwesenheit des Plastide-kodierten, E.-coli-artigen Enzyms die Expression mancher Photogene drastisch vermindert ist. Im Gegensatz dazu sind die Transkriptmengen für die Plastidegene, die für den Genexpressionsapparat kodieren, ähnlich den Mengen in Pflanzen der Wildform. Daher transkribiert die Nicht-E.-coli-artige RNA-Polymerase selektiv eine Untermenge von Plastidegenen. Dieser zweite Transkriptionsapparat initiiert nicht aus typischen E.-coli- σ^{70} -Promotoren, sondern erkennt eine neue Promotorsequenz.

[0033] Plasmidkonstruktion. Plasmid pLAA57 ist ein Derivat von pBSKS+ (Stratagene), das ein Sac-I- → Bam-HI-Fragment (Nucleotide 22.658–29.820) der ptDNA trägt. Ein internes Sac-I- → Sma-I-DNA-Fragment im ptDNA-Insert zwischen den Nucleotiden 24.456 und 28.192 wurde durch ein chimäres Spectinomycin-Resistenz- (aadA-) Gen ersetzt. Das aadA-Gen ist identisch mit dem beschriebenen (Z. Svab und P. Maliga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 913 (1993)) mit der Ausnahme, dass die psbA-3'-Region kürzer ist und wie beschrieben (J. M. Staub und P. Maliga, Plant J. 6, 547 (1994)) in einem Xba-I- → Dra-I-Fragment enthalten ist.

[0034] Pflanzentransformation. Zur Plastidetransformation wurden Wolframpartikel mit pLAA57-DNA beschichtet (Z. Svab und P. Maliga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 913 (1993)) und in die Blätter von *Nicotiana tabacum*-Pflanzen unter Verwendung der PDS1000He-Biolistic-Gun von DuPont bei 1.100 psi eingeschleust. Transgene Sprösslinge wurden aseptisch auf 500 mg/ml Spectinomycin-Dihydrochlorid enthaltendem RMOP-Medium selektiert (Z. Svab, P. Hajdukiewicz, P. Maliga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 8526 (1990)). Transgene Stecklinge wurden einwurzeln gelassen und auf RM-Medium gehalten, das aus Agar-verfestigten MS-Salzen besteht (T. Murashige und F. Skoog, Physiol. Plant. 15, 493 (1962)) und 3% Saccharose enthielt.

[0035] Elektronenmikroskopie. Elektronenmikroskopie wurde an vollständig entfalteten Blättern aus Wildform- und Δ rhoB-Stecklingen durchgeführt, die in steriler Kultur auf RM-Medium mit 3% Saccharose gezüchtet worden waren. Das Gewebe wurde 2 Stunden lang in 2% Glutaraldehyd, 0,2 M Saccharose, 0,1 M Phosphatpuffer (pH 6,8) bei Raumtemperatur fixiert und drei Mal in 0,2 M Saccharose, 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen. Fixierte Gewebe wurden in gepuffertem 1%-igen Osmiumtetroxid mit 0,2 M Saccharose nachfixiert, in einer abgestuften Ethanolreihe entwässert und in Spurr-Epoxyharz (hart) eingebettet, geschnitten und mit Uranylacetat und Bleicitrat für die Transmissionselektronenmikroskopie kontrastiert.

[0036] Gelblots. Blatt-Gesamt-DNA wurde wie beschrieben hergestellt (I. J. Mettler, Plant Mol. Biol. Rep. 5, 346 (1987)), mit Restriktionsendonuclease PstI verdaut, an 0,7%-igen Agarosegelen getrennt und unter Verwendung des Posiblot-Transfer-Geräts (Stratagene) auf Hybond N (Amersham) übertragen. Die Hybridisierung an ein Zufalls-Primer-markiertes Fragment wurde in Rapid Hybridisation Buffer (Amersham) über Nacht bei 65°C durchgeführt. Blatt-Gesamt-DNA wurde unter Verwendung von TRIzol (GIBCO BRL) nach dem Protokoll des Herstellers hergestellt. Die RNA wurde der Elektrophorese an 1%-igen Agarose/Formaldehyd-Gelen unterzogen und dann auf Nylonmembran übertragen und wie für die DNA-Blots sondiert.

[0037] Synthese der Sonden. Doppelsträngige DNA-Sonden für psbA, atpI und rp116 wurden mittels zufallsgeprimter ³²P-Markierung von PCR-erzeugten DNA-Fragmenten hergestellt. Die Sequenzen der für die PCR verwendeten Primer gemeinsam mit ihren Positionen in der Tabak-ptDNA (K. Shinozaki et al., EMBO J. 5, 2043 (1986)) sind die folgenden: psbA, 5'-Primer = 5'-CGCTTCTGTAAGTGG-3' (komplementär zu den Nucleotiden 1.550 bis 1.536 der ptDNA), 3'-Primer = 5'-TGACTGTCAACTACAG-3' (Nucleotide 667 bis 682); atpI, 5'-Primer = 5'-GTTCCATCAATACTC-3' (komplementär zu den Nucleotiden 15.985 bis 15.971), 3'-Primer = 5'-GCCGCGGCTAAAGTT-3' (Nucleotide 15.292 bis 15.306); rp116, 5'-Primer = 5'-TCCCACGTTCAAGGT-3' (komplementär zu den Nucleotiden 84.244 bis 84.230), 3'-Primer = 5'-TGAGTTCGTATAGGC-3' (Nucleotide 83.685 bis 83.699). Um Sonden für rbcL, psbD/C und 16S-rRNA zu erzeugen, wurden die folgenden restriktionsverdauten DNA-Fragmente ³²P-markiert: rbcL, ein Bam-HI-Fragment (Nucleotide 58.047 bis 59.285 in der ptDNA); psbD/C, ein Sac-II- → Hind-III-Fragment des Tabak-psbD/C-Operons (Nucleotide 34.691–36.393); 16S-rRNA, ein Eco-RI- → Eco-RV-Fragment (Nucleotide 138.447 bis 140.885 in der ptDNA).

[0038] Die Sonde für Tabak-25S-rRNA stammte aus pKDR1 (D. Dempsey, K. W. Wobbe, D. F. Klessig, Mol. Plant Path. 83, 1021 (1993)) und enthielt ein Eco-RI-Fragment von 3,75 kb aus einem in Plasmid pBR325 klonierten Tabak-25S/18S-Locus. Beim Hybridisieren von Gelblots auf 25S-rRNA wurde ³²P-markierte doppelsträngige DNA-Sonde mit unmarkiertem Plasmid pKDR1 entsprechend einem 2fachen Überschuss gegenüber der Menge von auf dem Filter vorhandener RNA gemischt.

[0039] Normieren von DNA-Mengen mittels Plastidegenom-Kopiezahl. Um zu testen, ob Veränderungen der Plastidegenom-Kopiezahl zu den abgeschätzten Unterschieden der Genexpression beitrugen, wurden zelluläre Gesamt-DNA und -RNA aus gleichen Mengen Blattgewebe von Wildform- und Δ rhoB-Pflanzen hergestellt. Um die Anzahl von Plastidegenomkopien pro Äquivalent Blattmasse zu vergleichen, wurden DNA-Gelblots mit einem gleichen Volumen jedes DNA-Präparats durchgeführt und mit einem radioaktiv markierten Eco-RI- → Eco-RV-Fragment (von den Nucleotiden 138.447 bis 140.845 der ptDNA (K. Shinozaki et al., EMBO J. 5, 2043 (1986))) der 16SrDNA-Sequenz sondiert. Die Quantifizierung mittels PhosphorImage-Analyse zeigte eine gleiche Anzahl von Plastidegenomkopien in jeder Probe. Die mittels RNA-Gelblots an gleichen Volumina jedes

RNA-Präparats gemessene Menge an 16S-rRNA aus gleichen Gewebeproben war in den Δ rpoB-Pflanzen um das 2,5fache vermindert. Dieser Wert war der geschätzten 3fachen Verminderung bei Normierung mit dem zytoplasmatischen 25S-rRNA-Signal (**Fig. 3B**) ähnlich.

[0040] Primerextensionsreaktionen. Primerextensionsreaktionen wurden an 3 μ g (Wildform) oder 10 μ g (Δ rpoB) Blatt-Gesamt-RNA wie beschrieben (L. A. Allison und P. Maliga, EMBO J., im Druck) unter Verwendung der folgenden Primer durchgeführt: 16SrRNA: 5'-TTCATAGTTGCATTACTTATAGCTTC-3' (komplementär zu den Nucleotiden 102.757–102.732); rbcL: 5'-ACTTGCTTTAGTCTCTGTTTGTGGTGACAT (komplementär zu Nucleotiden 57.616–57.587). Sequenzleitern wurden mit denselben Primern unter Verwendung des Sequenase-II-Sets (USB) erzeugt.

[0041] Identifizierung primärer Transkripte mittels In-vitro-Capping. Blatt-Gesamt-RNA (20 μ g) aus Wildform- und Δ rpoB-Pflanzen wurde in Gegenwart von [α - 32 P]GTP (J. C. Kennell und D. R. Pring, Mol. Gen. Genet. 216, 16 (1989)) gecappt. Markierte 16SrRNAs wurden mittels Ribonucleaseschutz (A. Vera und M. Sugiura, Plant Mol. Biol. 19, 309 (1992)) unter Verwendung des RPAII-Sets (Ambion) detektiert. Um die schützende komplementäre RNA herzustellen, wurde die 16SrDNA-Stromaufregion (Nucleotide 102.526–102.761 der ptDNA) unter Verwendung der folgenden Primer PCR-amplifiziert: der 5'-Primer war 5'-CCTCTAGACCCTAAGC-CCAATGTG-3', entsprechend den Nucleotiden 102.526 und 102.541 der ptDNA (K. Shinozaki et al., EMBO J. 5, 2043 (1986), unterstrichen) plus eine XbaI-Stelle; der 3'-Primer war 5'-CCGGTACCGAGATTCATAGTTGC-ATTAC-3', komplementär zu den Nucleotiden 102.761 bis 102.742 der ptDNA (unterstrichen) plus eine KpnI-Stelle. Das amplifizierte Produkt wurde als ein XbaI- \rightarrow KpnI-Fragment in den XbaI- und KpnI-restriktionsverdauten pBSKS+-Vektor (Stratagene) kloniert. Um zum 5'-Ende von 16SrRNAs komplementäre unmarkierte RNA zu erzeugen, wurde das resultierende Plasmid mit XbaI linearisiert und in einer Megascript- (Ambion) Reaktion mit T3-RNA-Polymerase transkribiert. Marker (100, 200, 300, 400 und 500 Nucleotide) wurden mit dem RNA-Century-Markers-Template-Set (Ambion) nach dem Protokoll des Herstellers hergestellt. Der 72-Nucleotid-Marker war das reife prozessierte Transkript aus dem Plastide-trnV-Gen und wurde mittels RNAse-Schutz erzeugt.

Ergebnisse und Diskussion

[0042] Die Zerstörung der E.-coli-artigen RNA-Polymeraseaktivität in Tabak-Plastiden resultiert in einem pigmentarmen Phänotyp. Um die Zerstörung anderer Funktionen der Plastidegene zu vermeiden, wurde zur Deletion auf das rpoB-Gen abgezielt, da es das erste Leseraster eines Operons ist, das ausschließlich für Untereinheiten der E.-coli-artigen Plastidepolymerase kodiert (K. Shinozaki et al., EMBO J. 5, 2043 (1986)). Die Deletion wurde durch Ersetzen des Großteils der für rpoB kodierenden Region (3.015 von 3.212 Basenpaaren) und von 691 bp der nichtkodierenden Strom-auf-Sequenz durch ein chimäres Spectinomycin-Resistenz- (aadA-) Gen (Z. Svab und P. Maliga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 913 (1993)) in einem klonierten Plastiden-DNA- (ptDNA-) Fragment erreicht. Das resultierende Plasmid wurde durch Partikelbeschuss in Tabak-Chloroplasten eingeführt, wo das aadA-Gen in das Plastidegenom über flankierende Plastide-DNA-Sequenzen wie in **Fig. 1A** dargestellt integrierte. Da das genetische System der Plastiden mit bis zu 10.000 identischen Kopien der ptDNA pro Blattzelle höchst polyploid ist, wurde eine selektive Amplifikation transformierter Genkopien durchgeführt, indem das beschossene Gewebe auf Spectinomycin enthaltendem Medium gezüchtet wurde (P. Maliga, Trends Biotechnol. 11, 101 (1993)).

[0043] Aus der anfänglichen Selektionsrunde wurden mehrere Spectinomycin-resistente Pflanzen erhalten, die Sektoren von weißem Blattgewebe aufwiesen (**Fig. 2A**). Die DNA-Gelblotanalyse weißer und grüner Sektoren zeigte an, dass der Pigmentmangel mit der Deletion von rpoB in drei unabhängig transformierten Linien korrelierte (**Fig. 1B**). Die meisten DNA-Proben aus dem pigmentarmen Gewebe, beispielsweise Bahn 4 in **Fig. 1B**, enthielten ein Gemisch aus Wildform- und transformierten Genomkopien. Das vollständige Fehlen von Wildform-ptDNA-Kopien war für die Interpretation der Daten entscheidend. Daher wurden, um nur transformierte Plastidegenome enthaltende Pflanzen zu erhalten, Sprösslinge aus den Sektoren mit weißem Gewebe regeneriert. Dieses Verfahren lieferte einheitlich weiße Pflanzen (**Fig. 2A**), die keine ptDNA der Wildform enthielten, wie mittels DNA-Gelblotanalyse beurteilt wurde (**Fig. 1C**). Die Regeneration aus diesen weißen Blättern auf Spectinomycinfreiem Medium lieferte ausschließlich pigmentarme Sprösslinge, was die vollständige Abwesenheit von Plastidegenomen der Wildform in allen Blattschichten und Zelltypen bestätigte.

[0044] Es ist schwierig, Samen aus Tabakpflanzen zu erhalten, die in steriler Kultur gezüchtet wurden. Zufälligerweise erhielten die Erfinder während der Pflanzenregeneration aus primären Transformanten eine Periklinchimäre (S. Poethig, Trends Genetics 5, 273 (1989)), die für die Plastidemutation in der L2-Blattschicht homoplasmisch war (**Fig. 2A**). Diese Linie wurde auf Tabak der Wildform gepfropft und wurde im Gewächshaus

zur Reife gebracht (**Fig. 2B**). Samen aus selbstbestäubenden Blüten lieferten einheitlich weiße Sämlinge, in denen mittels DNA-Gelblotanalyse keine Plastidegenome der Wildform nachgewiesen werden konnten (**Fig. 1C**).

[0045] Plastiden in Blättern der $\Delta rpoB$ -Pflanzen fehlen die Thylakoidmembranen. Die pigmentarmen $\Delta rpoB$ -Pflanzen waren unfähig, photoautotroph zu wachsen. Wenn sie jedoch zum Ausgleich ihres Mangels an Photosynthese auf Saccharose enthaltendem Medium gehalten wurden, wuchsen sie normal, jedoch mit einer verminderten Geschwindigkeit im Vergleich zu Pflanzen der Wildform, und zeigten keine merklichen Änderungen der Organmorphologie. Darüber hinaus keimten $\Delta rpoB$ -Sämlinge mit höherer Effizienz und entwickelten sich zu Pflanzen. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die E.-coli-artige Plastide-RNA-Polymerase für die Erhaltung der für Pflanzenwachstum und Differenzierung notwendigen, nicht-photosynthetischen Plastidefunktionen nicht erforderlich ist.

[0046] Eine Untersuchung der Plastide-Ultrastruktur in Blatt-Mesophyllzellen der $\Delta rpoB$ -Pflanzen offenbarte, dass die mutierten Plastiden kleiner und runder als Chloroplasten der Wildform waren und eine mittlere Länge von 2–5 μm im Vergleich zu 5–9 μm für Chloroplasten der Wildform aufwiesen. Die $\Delta rpoB$ -Plastiden sind daher größer als undifferenzierte Proplastiden, deren mittlere Länge 1 μm beträgt (M. R. Thomas und R. J. Rose, *Planta* 158, 329 (1983)). Außerdem enthielten $\Delta rpoB$ -Plastiden typischerweise mehrere Vesikel unregelmäßiger Größe und Form, und es fehlten ihnen die gestapelten Thylakoidmembrananordnungen, die für photosynthetisch aktive Chloroplasten charakteristisch sind (**Fig. 3**).

[0047] Die Transkription von Plastidegenen wird in $\Delta rpoB$ -Plastiden aufrechterhalten. In Abwesenheit der β -Untereinheit wurde keine Transkription aus Plastidepromotoren des σ^{70} -Typs erwartet. Um zu ermitteln, ob irgendeine Transkriptionsaktivität in den $\Delta rpoB$ -Plastiden aufrechterhalten wurde, wurde die Anreicherung von RNAs mittels RNA-Gelblotanalyse untersucht. Transkripte wurden auf zwei verschiedene Klassen von Plastidegenen überprüft (K. Shinozaki et al., *EMBO J.* 5, 2043 (1986)). Die erste Gruppe umfasste Gene, die für Untereinheiten des photosynthetischen Apparates kodieren: das *psbD/C*-Operon, das für die Untereinheiten D2 und CP43 des Photosystems II kodiert; *rbcL*, das für die große Untereinheit von Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase kodiert; und *psbA*, das für die D1-Untereinheit des Photosystem-II-Reaktionszentrums kodiert. Die zweite Gruppe enthielt Gene für Komponenten des Genexpressionsapparats: *rp116*, das für eine ribosomale Proteinuntereinheit kodiert, und das 16SrDNA-Gen. Alle Plastide-RNA-Quantifizierungen wurden gegen zytoplasmatische ribosomale 25S-RNA-Mengen normiert.

[0048] Überraschenderweise wurde eine Anreicherung von mRNAs für alle der untersuchten Gene detektiert. Jedoch war die Wirkung der *rpoB*-Deletion auf die Transkriptanreicherung für die beiden Klassen von Genen drastisch unterschiedlich. Die stationären mRNA-Konzentrationen der photosynthetischen Gene *psbD/C*, *rbcL* und *psbA* waren im Vergleich zu den Wildform-Konzentrationen um das 40- bis 100fache vermindert (**Fig. 4A**; Signale waren bei längerer Exposition in allen $\Delta rpoB$ -Bahnen sichtbar). Im Gegensatz dazu wurden die Transkriptmengen für Kern-kodierte Polymerasegene weit weniger beeinflusst. Es wurde eine 3fache Verminderung für 16S-rRNA gemessen, und eine tatsächliche Erhöhung für die mehrfachen Transkripte, die aus dem das *rpl16*-Gen enthaltenden polycistronischen Operon entstehen, wurde ebenfalls beobachtet (**Fig. 4B**). Diese Daten weisen darauf hin, dass, während die Expression von Genen, die für den photosynthetischen Apparat kodieren, in $\Delta rpoB$ -Pflanzen defekt ist, sich die RNAs für Gene, die an den Haushaltsfunktionen beteiligt sind, ungefähr auf das Ausmaß der Wildform oder mehr anreichern.

[0049] Das 16SrDNA-Gen wird aus einem neuen Promotor in $\Delta rpoB$ -Pflanzen transkribiert. Die Anreicherung von Plastide-RNAs bestätigte, dass eine RNA-Polymeraseaktivität in Plastiden vorliegt, denen die β -Untereinheit des E.-coli-artigen Enzyms fehlt. Jedoch ist die Migration von Plastidegenen zum Kern nachgewiesen worden (S. L. Baldauf und J. D. Palmer, *Nature* 334, 262 (1990); J. S. Gantt, S. L. Baldauf, P. J. Calie, N. F. Weeden und J. D. Palmer, *EMBO J.* 10, 3073 (1991); M. W. Gray, *Curr. Op. Genet. Dev.* 3, 884 (1993)). Daher wäre es denkbar, dass die Transkription in $\Delta rpoB$ -Plastiden aus σ^{70} -Typ-Promotoren initiiert, wenn eine Kernkopie von *rpoB* existierte, dessen Produkt in Plastiden importiert und zu einem funktionstüchtigen E.-coli-artigen Enzym assembliert werden könnte. Um festzustellen, ob die in $\Delta rpoB$ -Pflanzen nachgewiesenen Plastidetranskripte Produkte der Transkription aus einem σ^{70} -Typ-Promotor waren, wurden die 5'-Transkriptenden für vier Gene kartiert, nämlich *rbcL* (K. Shinozaki und M. Sugiura, *Gene* 20, 91 (1982)), 16SrDNA (A. Vera und M. Sugiura, *Curr. Genet.* 27, 280 (1995)), *psbA* (M. Sugita und M. Sugiura, *Mol. Gen. Genet.* 195, 308 (1984)) und *psbD* (W. B. Yao, B. Y. Meng, M. Tanaka, M. Sugiura, *Nucl. Acids Res.* 17, 9583 (1989)), für die die Transkriptionsinitiationsstellen früher ermittelt worden waren. Keines der 5'-Enden zeigte sich auf der Karte bei den σ^{70} -Typ-Promotorinitiationsstellen (Daten sind für *rbcL* und 16SrDNA in **Fig. 5A** dargestellt). Daher wurde der Schluss gezogen, dass die verbleibende RNA-Polymeraseaktivität in den $\Delta rpoB$ -Plastiden nicht auf ein E.-co-

li-artiges Enzym zurückzuführen war, jedoch ein zweites einzigartiges Plastidetranskriptionssystem darstellt. Dieses verschiedene RNA-Polymeraseenzym wird als Kern-kodierte Plastide-RNA-Polymerase (NEP, Nuclear-Encoded-Plastid-RNA-Polymerase) bezeichnet, um sie vom E.-coli-artigen Enzym zu unterscheiden, das die Erfinder als Plastide-kodierte Plastide-RNA-Polymerase (PEP, Plastid-Encoded-Plastid-RNA-Polymerase) bezeichnen. Da das Tabak-Plastidengenom vollständig sequenziert worden ist und da die wenigen nicht identifizierten Leseraster keine Sequenzähnlichkeit mit bekannten RNA-Polymeraseuntereinheiten aufweisen (K. Shinozaki et al., EMBO J. 5, 2043 (1986)), ist die Transkription durch die Kern-kodierte RNA-Polymerase auf Kerngenprodukte angewiesen.

[0050] In Abwesenheit der Transkription aus σ^{70} -Typ-Promotoren in den Δ rhoB-Pflanzen blieb die Frage, welche Promotoren die Quelle der Plastide-RNAs waren. Das in den Δ rhoB-Pflanzen nachgewiesene 16S-rRNA-5'-Ende wurde auf der Karte 62 Nucleotide stromauf des reifen 16S-rRNA-5'-Terminus (**Fig. 5A**) gezeigt. Dieses 5'-Ende wurde mittels In-vitro-Capping als ein primäres Transkript ermittelt (**Fig. 5B**). Ein markantes primäres Transkript mit einem ähnlichen 5'-Ende wurde neulich in Proplastiden von heterotroph kultivierten Tabakzellen beschrieben und wurde P2 genannt (A. Vera und M. Sugiura, Curr. Genet. 27, 280 (1995)); dieses Transkript ist in sehr niedrigen Mengen auch in Blattzellen der Wildform vorhanden (A. Vera und M. Sugiura, Curr. Genet. 27, 280 (1995); **Fig. 5A**, längere Exposition, nicht gezeigt). Die die Initiationsstelle umgebende Sequenz ist unter allen untersuchten Pflanzenspezies höchst konserviert und weist keine Ähnlichkeit mit der σ^{70} -Consensussequenz auf (A. Vera und M. Sugiura, Curr. Genet. 27, 280 (1995)). Auf Basis seiner herausragenden Verwendung in Δ rhoB-Pflanzen wurde der Schluss gezogen, dass dieser einzigartige Promotor vom NEP-Transkriptionsapparat genutzt wird.

[0051] Im Gegensatz zur 16S-rRNA wurden die hauptsächlichen Transkripte für die photosynthetischen Gene rbcL und psbD/C auf der Karte bei früher charakterisierten prozessierten Enden gezeigt (Daten für rbcL in **Fig. 5** dargestellt; L. Hanley-Bowdoin, E. M. Orozco und N. -H. Chua, Mol. Cell. Biol. 5, 2733 (1985); J. E. Mullet, E. M. Orozco und N. -H. Chua, Plant Mol. Biol. 4, 39 (1985); S. Reinbothe, C. Reinbothe, C. Heintzen, C. Seidenbecher und B. Parthier, EMBO J. 12, 1505 (1993)). Weitere untergeordnete Transkriptenden wurden auf der Karte stromauf der prozessierten Termini gezeigt. Daher sind die niedrigen Ausmaße der Transkriptanreicherung für diese photosynthetischen Gene das Ergebnis der Stromauf-Promotoraktivität und anschließenden Prozessierung der Read-through-RNAs, um Transkripte korrekter Größe zu erhalten.

[0052] Vorgeschlagene Rollen für die beiden Plastide-Transkriptionssysteme. In den Δ rhoB-Pflanzen tritt eine Anreicherung von RNAs auf, die vom NEP-System transkribiert werden. Dies weist auf eine Rolle für die Kern-kodierte RNA-Polymerase bei der Erhaltung der Expression von Plastide-Haushaltsgenen hin. Offenbar sind diese Expressionsausmaße ausreichend, um das Wachstum und die Differenzierung von nicht-photoautotrophen Pflanzen zu fördern. Im Gegensatz dazu ist die E.-coli-artige PEP-RNA-Polymerase erforderlich, um die hohen Mengen an Plastidegen-Transkripten bereitzustellen, die für die Entwicklung von photosynthetisch aktiven Chloroplasten notwendig sind. Die vorgeschlagene Rolle für die Kern-kodierte RNA-Polymerase impliziert einen hohen Bedarf für ihre Tätigkeit während der frühen Phasen der Chloroplastenentwicklung, bevor die PEP-RNA-Polymerase aktiv ist (J. E. Mullet, Plant Physiol. 103, 309 (1993)). Die entwicklungsmäßige Regulation einer Kern-kodierten RNA-Polymerase wird durch die Beobachtung unterstützt, dass der Kern-kodierte Polymerase-P2-Promotor des 16SrDNA-Gens in Proplastiden kultivierter Tabakzellen aktiver ist als in Blatt-Chloroplasten (A. Vera und M. Sugiura, Curr. Genet. 27, 280 (1995)).

Beispiel II

Transkription durch zwei unterschiedliche RNA-Polymerasen ist ein allgemeiner Regulationsmechanismus der Genexpression in höheren Pflanzen

[0053] Wie in Beispiel I beschrieben, führte die Anreicherung von Transkripten in Pflanzen, denen die PEP-Polymerase fehlt, zur Identifizierung eines NEP-Promotors für das ribosomale Plastide-RNA-Operon (Alison et al., EMBO J. 14, 3721–3730 (1996)). Um die Kartierung weiterer NEP-Promotoren zu erleichtern, wurde die mRNA-Anreicherung in Δ rhoB-Pflanzen für die meisten Klassen von Plastidegenen untersucht. Die hierin beschriebenen neuen Promotorsequenzen können verwendet werden, um die Palette von Spezies zu erweitern, bei denen eine solche Plastidetransformation durchführbar ist und um die Expression fremder Gene von Interesse auf eine gewebespezifische Weise anzutreiben.

Materialien und Verfahren für Beispiel II

[0054] RNA-Gelblots. Gesamt-Blatt-RNA wurde mittels TRIzol (GIBCO BRL) nach dem Protokoll des Herstel-

lers hergestellt. Die RNA wurde an 1%-igen Agarose/Formaldehyd-Gelen der Elektrophorese unterzogen und dann unter Verwendung des Posiblot-Transferapparats (Stratagene) auf Hybond N (Amersham) übertragen. Die Hybridisierung an das Zufalls-Primer-markierte Fragment wurde in Rapid Hybridisation (Amersham) über Nacht bei 65°C durchgeführt. Doppelsträngige DNA-Sonden wurden mittels zufallsgeprimter ³²P-Markierung von PCR-erzeugten DNA-Fragmenten hergestellt. Die Sequenz der zur PCR verwendeten Primer gemeinsam mit ihren Positionen in der Tabak-ptDNA (Shinozaki et al. (1996), s. o.) sind die Folgenden:

Gen	5'-Nucleotid-position in Plastide-DNA	Sequenz
accD	60221	GGATTTAGGGGCGAA
	60875	GTGATTTTCTCTCCG
atpB	56370 (C)	AGATCTGCGCCCCGCC
	55623	CCTCACCAACGATCC
atpI	15985 (C)	GTTCCATCAATACTC
	15292	GCCGCGGCTAAAGTT
clpP	73621 (C)	GACTTTATCGAGAAAG
	73340	GAGGGAATGCTAGACG
ndhA	122115 (C)	GATATAGTGGAAGCG
	121602	GTGAAAGAAGTTGGG
ndhB	97792 (C)	CAGTCGTTGCTTTTC
	97057	CTATCCTGAGCAATT
ndhF	113366 (C)	CTCGGCTTCTTCCTC
	112749	CTCCGTTTTTACCCC
ORF1901	129496 (C)	GTGACTATCAAGAGG
	128895	GACTAACATACGCCCC
ORF2280	92881	GCTCGGGAGTTCCTC
	93552	TGCTCCCGGTTGTTC
petB	78221	GGTTCGAAGAACGTC
	78842	GGCCCAGAAATACCT
psaA	43467 (C)	TTCGTTCCGCCGAACC
	42743	GATCTCGATTCAAGAT
psbB	75241	GGAGCACATATTGTG
	75905	GGATTATTGCCGATG
psbE	66772 (C)	CAATATCAGCAATGCAGTTCATCC
	66452	GGAATCCTTCCAGTAGTATCGGCC
rps14	38621	CACGAAGTATGTGTCCGGATAGTCC
rpl33/rpl18	70133	GGAAAGATGTCCGAG
	70636	GTTCACTAATAAATCGAC

[0055] Die rps16-mRNA wurde mit einem aus Plasmid pJS40 isolierten EcoRI-Fragment sondiert, das Sequenzen zwischen den Nucleotiden 4.938/5.363 und 6.149/6.656 der Tabak-ptDNA enthielt (Shinozaki et al. (1986), s. o.). Die Sonde für Tabak-25SrRNA stammte aus Plasmid pKDR1 (Dempsey et al., Mol. Plant Path. 83, 1021 (1993)), das ein 3,75-kb-EcoRI-Fragment aus einem in Plasmid pBR325 klonierten Tabak-25S/18S-Locus enthält. Bei der Hybridisierung von Gelblots auf 25S-rRNA wurde ³²P-markierte doppelsträngige DNA-Sonde mit unmarkiertem Plasmid pKDR1 entsprechend einem 2fachen Überschuss gegenüber der am Filter vorhandenen RNA-Menge gemischt.

[0056] Primerextensionsreaktionen. Primerextensionsreaktionen wurden an 10 µg (Wildform) oder 10 µg

(Δ rpoB) Blatt-Gesamt-RNA wie beschrieben (Allison und Maliga, EMBO J. 15, 2802–2809 (1995)) durchgeführt. Die Primer sind unten aufgezählt. Unterstrichene Oligonucleotide wurden ebenfalls verwendet, um die Capping-Konstrukte zu erzeugen.

Gen	5'-Nucleotidposition in Plastide-DNA	Sequenz
accD	59758	<u>CCGAGCTCTTATTTCTATCAGACTAAGC</u>
atpB	56736	CCCCAGAACCAGAAGTAGTAGGATTGA
atpI	15973	GTATTGATGGAACATGATAGAACAT
clpP#1	74479	GGGACTTTTGGAACACCAATAGGCAT
clpP#2	74947	<u>GGGAGCTCCATGGGTTTGCCTTGG</u>
ORF1901	31451	CTTCATGCATAAGGATACTAGATTACC
ORF2280	87419	<u>GGGAGCTCTACATGAAGAACATAAGCC</u>
rps2	16921	CCAATATCTTCTGTTCATTTCTCTC
rps16	6185	CATCGTTTCAAACGAAGTTTTACCAT

[0057] Sequenzleitern wurden mit denselben Primern unter Verwendung des Sequenase-II-Sets (USB) erzeugt.

[0058] Identifizierung primärer Transkripte mittels In-vitro-Capping. Blatt-Gesamt-RNA (20 mg) aus Wildform- und Δ rpoB-Pflanzen wurde in Gegenwart von [α -³²P]GTP gecappt (Kennell und Pring, Mol. Gen. Genet. 216, 16–24 (1989)). Markierte RNAs wurden mittels Ribonucleaseschutz (Vera und Sugiura (1992), s. o.) unter Verwendung des RPAII-Sets (Ambion) nachgewiesen. Um die schützende komplementäre RNA herzustellen, wurde die 16SrDNA-Stromaufregion (Nucleotide 102.526–102.761 der ptDNA) unter Verwendung der unten aufgezählten Primer PCR-amplifiziert. Die 5'-Primer wurden so konstruiert, dass sie eine XbaI-Restriktionsstelle (unterstrichen) stromauf des amplifizierten Fragments anfügten. Die 3'-Primer wurden so konstruiert, dass sie eine KpnI-Stelle (unterstrichen) stromab der amplifizierten Sequenz anfügten. Das amplifizierte Produkt wurde als XbaI- → KpnI-Fragment in mit XbaI und KpnI restriktionsverdauten pBSKS+-Vektor (Stratagene) kloniert. Um zum 5'-Ende von RNAs komplementäre unmarkierte RNA zu erzeugen, wurde das resultierende Plasmid mit XbaI linearisiert und in einer Megascript- (Ambion) Reaktion mit T3-RNA-Polymerase transkribiert. Marker (100, 200, 300, 400 und 500 Nucleotide) wurden mit dem RNA-Century-Markers-Template-Set (Ambion) nach dem Protokoll des Herstellers hergestellt.

Gen	5'-Nucleotidposition in Plastid-DNA	Sequenz
accD	59758	<u>CCGAGCTCTTATTTCTATCAGACTAAGC</u>
	59576	<u>CCGGTACCATAGGAGAAGCCGCCC</u>
atpB	56750	<u>CCGAGCTCGTAGTAGGATTGATTCTCA</u>
	57131 (C)	<u>CCGGTACCGGAGCCAATTAGATACAAA</u>
atpI	15895	<u>CCGAGCTCTGACTTGGAACCCCC</u>
	16277 (C)	<u>CCGAATTCTAGTATTCGCAATTGT</u>
clpP	74462	<u>GGGAGCTCCAGGACTTCGGAAGG</u>
	74752 (C)	<u>GGGGTACCAATACGCAATGGGG</u>
	74947	<u>GGGAGCTCCATGGGTTTGCTTGG</u>
	75080 (C)	<u>GGGGTACCGCTAATTCATACAGAG</u>
ORF1901	31424	<u>GGGAGCTCCGACCACAACGACCG</u>
	31724 (C)	<u>GGGGTACCCTTACATGCCTCATTTC</u>
ORF2280	87419	<u>GGGAGCTCTACATGAAGAACATAAGCC</u>
	87154	<u>GGGGTACCGTGCCTAAGGGCATATCGG</u>

[0059] DNA-Sequenzanalyse. DNA-Sequenzanalyse wurde unter Einsatz des Wisconsin Sequence Analysis Package (Genetics Computer Group Inc.) durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

[0060] Auf Basis der Anreicherung von mRNAs in Wildform- und Δ poB-Blättern können die Plastidegene in drei Klassen unterteilt werden. Die erste Klasse umfasst Gene, für die sich die mRNAs in großen Mengen in Blättern der Wildform und in sehr geringen Mengen in den Blättern von Δ poB-Pflanzen anreichern (**Fig. 6A**). Gene, die dieser Klasse angehören, sind psaA (Photosystem-I-Gen), psbB und psbE (Photosystem-II-Gene), petB (Cytochrom-b6/f-Komplex-Gen), ndhA (Atmungsketten-NADH-Dehydrogenase-Homolog; Matsubayashi et al., Mol. Gen. Gent. 210, 385–393 (1987)) und rps14 (Ribosomenprotein-Gen). Die zweite Klasse umfasst Plastidegene, für die sich die mRNAs in etwa gleichen Mengen in Wildform- und Δ poB-Blättern anreichern (**Fig. 6B**). Diese Klasse umfasst atpB (ATP-Synthase-Gen), ndhF (Atmungsketten-NADH-Dehydrogenase-Homolog-Gen; Matsubayashi et al. (1987), s. o.), rps16 (Ribosomenprotein-Gen) und ORF1901 (ein Gen mit unbekannter Funktion; Wolfe et al., J. Mol. Biol. 223, 95–104 (1992)). Die dritte Klasse umfasst Gene, für die in den Δ poB-Blättern signifikant mehr mRNA vorliegt als in den Blättern von Pflanzen der Wildform (**Fig. 6C**). Typisch für diese Klasse sind rpl33 und rpl18 (Ribosomprotein-Gene), accD (für eine Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase kodierend; Sasaki et al., Plant Physiol. 108, 445–449 (1993)) und ORF2280 (mutmaßliche ATPase mit unbekannter Funktion; Wolfe, Curr. Genet. 25, 379–383 (1994)). Zwei weitere Gene dieser Klasse, ndhB (Atmungsketten-NADH-Dehydrogenase-Homolog; Matsubayashi et al. (1987), s. o.) und clpP (für die proteolytische Untereinheit der ATP-abhängigen Clp-Protease kodierend; Maurizi et al., J. Biol. Chem. 265, 12546–12552 (1990); Gray et al., Plant Mol. Biol. 15, 947–950 (1990)), bilden eine Untergruppe dieser Klasse, die signifikante Mengen an mRNA in Blättern der Wildform aufweisen.

[0061] Die atpB- und atpI-ATP-Synthasegene weisen NEP- sowie PEP-Promotoren auf.

[0062] Die RNA-Gelblotanalyse identifizierte eine Reihe von Genen und Operonen, für die hohe Transkriptmengen in Δ poB-Blättern aufrechterhalten werden. Um zusätzliche NEP-Promotoren zu identifizieren, ist das 5'-Ende mehrerer Transkripte mittels Primerextensionsanalyse kartiert worden. 5'-Enden können jene der primären Transkripte sein, die einen Promotor kennzeichnen, oder die durch RNA-Prozessierung erzeugt werden. Da primäre Plastidetranskripte Triphosphatgruppen an ihren 5'-Enden beibehalten, ermöglichte die spezifische [32 P]-GMP-Übertragung auf diese RNA-Moleküle durch das Enzym Guanylyltransferase die genaue Unterscheidung zwischen primären Transkripten und prozessierten Enden. Für das Tabak-atpB-Operon sind Transkript-5'-Enden von Orozco et al., Curr. Genet. 17, 65–71 (1990), an den Nucleotidpositionen –611, –502, –488, –289 und –255 stromauf des Translationsinitiationscodons identifiziert worden (**Fig. 7C**). Die 5'-Enden sind relativ zum Translationsinitiationscodon (ATG) nummeriert, wenn das Nucleotid direkt stromauf von A sich

an Position –1 befindet. Die Primerextensionsanalyse identifizierte jedes dieser 5'-Enden in den Pflanzen der Wildform der Erfinder (**Fig. 7A**). In der Δ rhoB-Probe war nur die –289-RNA-Spezies vorhanden, deren 5'-Ende ein Substrat für Guanylyltransferase war (**Fig. 7B**). Daher wird die –289-RNA aus einem NEP-Promotor, PatpB-289, transkribiert. Interessanterweise ist das –289-Transkript in den Blättern der Wildform vorhanden, obgleich es weniger häufig als in den Δ rhoB-Pflanzen ist. Die –255-, –488- und –611-Transkripte fehlen in den Δ rhoB-Pflanzen (**Fig. 7A**). DNA-Fragmente, die diese Promotoren enthalten (nicht jedoch PatpB-289), werden von der E.-coli-RNA-Polymerase erkannt (Orozco et al. (1990), s. o.) und werden durch PEP in Plastiden transkribiert. Das atpA-Operon umfasst die atpI, -atpH-atpF-atpA-Gene (**Fig. 8C**). In Tabakblättern der Wildform sind die mRNA-5'-Enden an drei Regionen stromauf von atpI kartiert worden: die –209-Region, wobei 5'-Enden auf der Karte bei den Nucleotiden –212, –209 und –207 gezeigt wurden, und 5'-Enden bei den Nucleotiden –130 und –85. In Δ rhoB-Blättern ist nur das –207-Transkript detektierbar (**Fig. 8A**). Dieses Transkript konnte in der Δ rhoB-RNA-Probe gecappt werden (**Fig. 8B**), und daher wird es von einem NEP-Promotor transkribiert.

[0063] Ein Signal an dieser Position wurde auch in der In-vitro-Capping-Reaktion von RNA-Proben der Wildform erhalten. Die –209- und –212-Transkripte könnten auf die Aktivität eines überlappenden PEP-Promotors oder auf die Bildung mehrerer Transkripte aus dem NEP-Promotor in Pflanzen der Wildform zurückzuführen sein. Das –130-Transkript, das nur in Blatt-RNA der Wildform vorhanden ist, konnte ebenfalls gecappt werden (**Fig. 8A, 8B**). Da Sequenzen vorliegen, die den –10/–35-Elementen am korrekten Zwischenraum stromauf dieses 5'-Endes ähnlich sind, wird es von der PEP-Polymerase transkribiert.

[0064] Ein clpP-NEP-Promotor wird in Chloroplasten in höchstem Ausmaß exprimiert.

[0065] Das clpP-Protease-Untereinheit-Gen gehört ebenfalls zu derjenigen Klasse, die sowohl NEP- als auch PEP-Promotoren aufweist. Die Primerextensionsanalyse in den Pflanzen der Wildform identifizierte RNA-5'-Enden an den Nucleotidpositionen –53, –95 und –173, während die Karte in Δ rhoB-Pflanzen die 5'-Enden an die –53-, –173- und –511-Nucleotidpositionen zeigt (**Fig. 9A**). Die In-vitro-Capping-Reaktion verifiziert, dass alle dieser drei primäre Transkripte sind (**Fig. 9B**). Drei der Transkripte leiten sich von NEP-Promotoren her. Der PclpP-53-Promotor wird in Wildform- sowie Δ rhoB-Pflanzen in höchstem Ausmaß exprimiert und stellt folglich eine selbstständige Klasse von NEP-Promotoren mit einem Potenzial für die starke Expression in verschiedenen Gewebetypen dar. Der PclpP-53-Promotor ist im Spinat gut konserviert (Westhoff, Mol. Gen. Genet. 201, 115–123 (1985)). Weitere clpP-Promotoren für NEP sind PclP-173 und PclP-511. Da das PclpP-511-Transkript sich nur in Δ rhoB-Pflanzen anreichert (**Fig. 9A**), ist es ein Kandidat für den regulierten NEP-Promotor. Man beachte ferner, dass das PclpP-511 sich innerhalb der psbB-Kodierungsregion befindet und seine Expression durch den konvergenten psbB-PEP-Promotor beeinflusst werden kann (**Fig. 9C**).

[0066] Der einzige PEP-Promotor direkt stromauf von clpP ist PclpP-95. RNAs aus diesem Promotor reichern sich nur in Blättern der Wildform an, und PclpP-95 weist Stromaufsequenzen auf, die an die konservierten –10/–35-Elemente erinnern (nicht dargestellt).

[0067] Das accD-Gen wird ausschließlich aus einem NEP-Promotor transkribiert.

[0068] Für das Lipidbiosynthese-Gen accD reichert sich mRNA in hohen Mengen nur in Δ rhoB-Pflanzen an. Ein hauptsächliches Transkript initiiert an der Nucleotidposition –129 (**Fig. 10A**), die in vitro gecappt werden kann (**Fig. 10B**). Daher wird diese RNA aus einem NEP-Promotor transkribiert. Da PaccD-129 keine signifikante Aktivität in den photosynthetisch aktiven Blatt-Mesophyllzellen aufweist, dient es als Kandidat für einen regulierten NEP-Promotor mit einem charakteristischen gewebespezifischen Expressionsmuster.

[0069] NEP-Promotoren haben einen der Transkriptionsinitiationsstelle benachbarten beweglichen Konsensus gemeinsam.

[0070] Sequenzen, welche die Transkriptionsinitiationsstellen flankieren, wurden vergleichend angeordnet, um konservierte NEP-Promotorelemente zu identifizieren (**Fig. 11**). In der vergleichenden Sequenzanordnung sind neun in dieser Untersuchung identifizierte Promotoren und Prn-62, der in Allison et al. (1996), s. o., beschriebene NEP-Promotor, umfasst. Sequenzen für PORF2280-1577 und PORF1901-41 sind ebenfalls umfasst, für deren 5'-Enden durch Capping in vitro gezeigt worden ist, dass sie primäre Transkripte sind (Daten nicht gezeigt). Beide dieser Promotoren sind in Δ rhoB-Blättern aktiv, nicht jedoch in den Blättern der Pflanzen der Wildform. Ebenfalls in der vergleichenden Sequenzanordnung umfasst sind vorläufige NEP-Promotoren für rps2 und rps16, für die mehr mRNA in Δ rhoB-Pflanzen vorliegt. Die 5'-Enden dieser Transkripte wurden mittels Primerextensionsanalyse kartiert. Der In-vitro-Capping-Test schlug wegen der niedrigen Menge der mRNAs fehl (Daten nicht gezeigt). Die mehrfache vergleichende Sequenzanordnung der die NEP-5'-Enden

unmittelbar flankierenden Regionen identifizierten einen beweglichen Consensus von 10 Nucleotiden rund um die Transkriptionsinitiationsstelle ([Fig. 11](#)). Eine Konservierung zusätzlicher Nucleotide stromauf und stromab ist ebenfalls offensichtlich. Auffallend ist das Fehlen von Sequenzkonservierung zwischen dem PclpP-53 und anderen NEP-Promotoren, welcher der einzige in Chloroplasten höchst aktive Promotor ist. Angesichts des Fehlens von Sequenzähnlichkeit wurde diese Sequenz nicht in die vergleichende Anordnung aufgenommen. Sequenzen rund um die PclpP-53-Transkriptionsinitiationsstelle sind gesondert am unteren Ende der [Fig. 11](#) dargestellt.

[0071] NEP- und PEP-Polymerasen stellen über die Erkennung einzelner Promotoren einen Mechanismus für die selektive Transkription von Plastidegenen bereit ([Fig. 12](#)). Die hierin bereitgestellten Daten beweisen, dass manche Gene nur PEP-Promotoren oder NEP-Promotoren aufweisen, während andere sowohl PEP- als auch NEP-Regulationssequenzen aufweisen.

Beispiel III

NEP-Promotoren zur Expression von selektierbaren Markergenen

[0072] Zwecks Vielseitigkeit und für universelle Anwendungen ist die Expression von selektierbaren Markergenen für die Plastidetransformation in allen Gewebetypen und in einem hohen Ausmaß wünschenswert. Selektierbare Markergene in den gegenwärtig eingesetzten Plastidetransformationsvektoren werden aus PEP-Promotoren exprimiert, die von der Plastide-kodierten RNA-Polymerase erkannt werden. Die PEP-Polymerase transkribiert photosynthetische Gene und manche der Haushaltsgene und scheint daher die dominante RNA-Polymerase in photosynthetisch aktiven Blattgeweben zu sein. Effiziente Plastidetransformation ist in Tabak auf Basis von Chloroplastentransformation in Blattzellen erzielt worden. Jedoch ist die Pflanzenregeneration nicht durchführbar oder ist aus den Blättern der meisten landwirtschaftlich bedeutenden Getreidefrüchten einschließlich Mais, Reis, Weizen und in Baumwolle nicht praktikabel. Bei diesen Feldfrüchten werden transgene Pflanzen typischerweise durch Transformieren embryogener Gewebekulturzellen oder von Sämlingsgewebe erhalten. Wenn man bedenkt, dass diese Gewebe nicht photosynthetisch sind, scheint die Expression von Markergenen durch NEP-Promotoren, die in nichtgrünen Geweben aktiv sind, besonders vorteilhaft zu sein und wird die Transformation von Plastiden in allen nicht-photosynthetischen Gewebetypen erleichtern.

[0073] Ein besonders zweckdienlicher Promotor zum Antrieb der Expression von Markergenen ist der PclpP-53-promotor. Dieser Promotor wird in den Proplastiden von Δ poB-Pflanzen im höchsten Ausmaß exprimiert und könnte daher auch in den Proplastiden embryogener Zellkulturen, die transgene Getreidepflanzen liefern, im höchsten Ausmaß exprimiert werden. Aus diesen Promotoren exprimierte Markergene werden weiters zweckdienlich sein, um Plastidetransformanten in beschossenen Blattkulturen zu selektieren, da sich dieser Promotor als in Chloroplasten aktiv erwiesen hat. Aus Promotoren, wie z. B. dem PclpP-53-Promotor, exprimierte Markergene werden breite Anwendung finden, um transformierte Plastiden zu erhalten.

[0074] Die selektierbaren Markergene werden unter Verwendung der in den US-Patenten Nr. 5.451.513 und 5.877.402 dargelegten Prinzipien konstruiert. Ein transformierendes DNA-Konstrukt ist in [Fig. 13](#) dargestellt. Im Spezielleren wird der PclpP-53-Promotor stromauf eines für einen Plastide-selektierbaren Marker kodierenden DNA-Segments kloniert. Signale für die Translation werden durch Inkorporieren geeigneter DNA-Sequenzen zwischen dem Promotorfragment und der für den selektierbaren Marker kodierenden Region bereitgestellt. 3'-untranslatierte Segmente eines Plastidegens werden stromab des selektierbaren Markers kloniert, um Signale für die Transkriptionstermination bereitzustellen und die chimäre mRNA zu stabilisieren. Der Einsatz der 3'-untranslatierten Region von aus NEP-Promotoren exprimierten Genen ist bevorzugt, da die Erfordernisse für die Transkriptionstermination für die NEP- und PEP-Polymerasen verschieden sein können.

[0075] PclpP-53 ist ein besonders starker NEP-Promotor. Jedoch könnten Pflanzen mit transformierten Plastiden auch mit schwachen Promotoren erhalten werden. Es gibt mehrere Beispiele für derartige schwache NEP-Promotoren in den vorangegangenen Beispielen, beispielsweise PclpP-173.

[0076] Expression von gewebespezifischen, von NEP-Promotoren angetriebenen Plastidetransgenen.

[0077] Die gewebespezifische Expression von Plastidetransgenen ist für viele Anwendungen wünschenswert. Die gewebespezifische Expression eines Proteins, welches das Pflanzengewebe für Wurzelnematoden abstoßend oder toxisch macht, kann in Wurzeln wünschenswert sein. Jedoch würde die Expression desselben Proteins in den Blättern die Pflanzenressourcen aufzehren und könnte die Ausnutzung der in der Luft befind-

lichen Pflanzenteile beeinträchtigen. Da sie am häufigsten in nichtgrünen Geweben exprimiert werden, sind die in dieser Anmeldung beschriebenen NEP-Promotoren und die aus der NEP-Polymerase im Allgemeinen exprimierten Promotoren eine reiche Quelle an gewebespezifischen Promotoren für die transgene Expression.

[0078] Mehrere Arten der NEP-Promotoren, beispielsweise PclpP-511, werden in Proplastiden von Δ poB-Pflanzen im höchsten Ausmaß exprimiert. Proplastiden sind im essbaren Teil des Karfiols (Blumenkohls) vorhanden. Daher wird die Expression fremder Gene im Karfiol im hohen Ausmaß aus diesem Promotor in den essbaren Teilen der Pflanze erwartet.

[0079] Das Plastidegen accD kodiert für eine Untereinheit der prokaryotischen Acetyl-CoA-Carboxylase, ein Enzym, das an der Lipidbiosynthese beteiligt ist. Interessanterweise ist die Menge an accD-mRNA in Blättern des Wildtyps niedrig, während sie in den Proplastiden von Δ poB-Pflanzen hoch ist. Diese Beobachtung legt nahe, dass PaccD-129 in nichtgrünen Plastiden von aktiv an der Lipidbiosynthese beteiligten Geweben aktiv ist, wie z. B. in den Plastiden des sich entwickelnden Samens, der reich an Öl ist.

Patentansprüche

1. DNA-Konstrukt zur stabilen Transformation von Plastiden von mehrzelligen Pflanzen oder Pflanzenzellen, das eine Transformations-DNA mit einem Targeting-Segment umfasst, welches eine Insertion der Transformations-DNA in das Plastidengenom durch homologe Rekombination bewirkt, wobei ein selektierbares Markergen, das Pflanzenzellen, die diese transformierten Plastiden und eine Klonierungsstelle zur Insertion einer zusätzlichen, für ein Fremdgen von Interesse kodierenden, exprimierbaren DNA enthalten, einen selektierbaren Phänotyp verleiht, worin die Verbesserung ein 5'-Promotorelement umfasst, das von einer Kern-kodierten Plastiden-RNA-Polymerase erkannt und transkribiert wird.

2. DNA-Konstrukt nach Anspruch 1, worin das Konstrukt in einen Vektor inkorporiert ist, der zur Transformation von Plastiden geeignet ist.

3. DNA-Konstrukt nach Anspruch 1, worin das Promotorelement aus Promotorelementen von Plastidengenomen ausgewählt ist, die aus der aus Prn-62, PORF2280-1577, PatpB-289, PORF1901-41, Prbs2-152, Prps16-107, PatpI-207, Pclp-511, Pclp-173, Pclp-53 und PaccD-129 bestehenden Gruppe ausgewählt sind.

4. DNA-Konstrukt nach Anspruch 2, worin das Promotorelement Pclp-95 ist.

5. DNA-Konstrukt nach Anspruch 1, das ein zusätzliches DNA-Segment enthält, das eine Transkriptionseinheit eines Gens umfasst, das für ein Protein oder einen Vorläufer davon kodiert.

6. DNA-Konstrukt nach Anspruch 5, worin die Transkriptionseinheit für ein selektierbares Markergen kodiert.

7. DNA-Konstrukt nach Anspruch 6, worin das selektierbare Markergen durch einen Promotor reguliert wird, der von einer Kern-kodierten Plastidenpolymerase transkribiert wird.

8. DNA-Konstrukt nach Anspruch 5, worin die Transkriptionseinheit für ein Reportergen kodiert.

9. DNA-Konstrukt nach Anspruch 5, worin das Konstrukt in einen Vektor inkorporiert ist, der zur Transformation von Plastiden geeignet ist.

10. Mehrzellige Pflanze, die mit einem DNA-Konstrukt nach Anspruch 1 stabil transformiert ist.

11. Mehrzellige Pflanze, die mit einem DNA-Konstrukt nach Anspruch 2 stabil transformiert ist.

12. Verfahren zum Erhalten einer Pflanzenzelle oder einer mehrzelligen Pflanze, wobei die Plastiden der Zelle mit zumindest einem Fremdgen von Interesse stabil transformiert wurden, umfassend die Verabreichung eines Folgendes umfassenden DNA-Konstrukts an eine Pflanzenzelle:

- a) ein Targeting-Segment, das eine DNA-Sequenz umfasst, die im Wesentlichen homolog zu einer vorgegebenen Plastidengenomsequenz mit einem zu transformierenden Plastid ist, wobei die Targeting-Sequenz homologe Rekombination mit der vorgegebenen Plastidengenomsequenz ermöglicht;
- b) ein selektierbares Markergen, das innerhalb des Targeting-Segments angeordnet ist, wobei das selektierbare Markergen Zellen, die Plastiden mit dem DNA-Konstrukt enthalten, einen selektierbaren Plastidenphäno-

typ verleiht; und

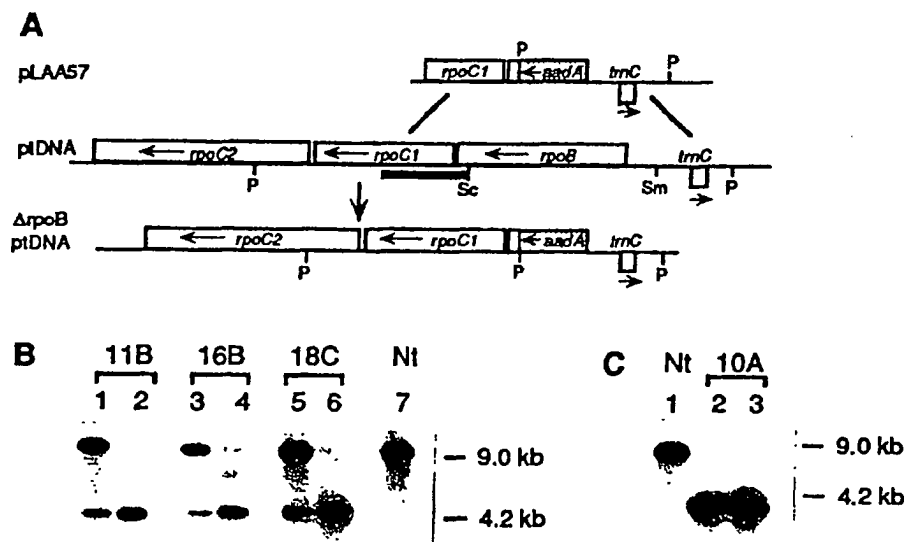
c) ein Fremdgen von Interesse, wobei das Gen durch einen Promotor reguliert wird, der von einer Kern-kodierten Plastiden-RNA-Polymerase erkannt wird;

d) Selektion bezüglich Zellen, die den Phänotyp exprimieren; und

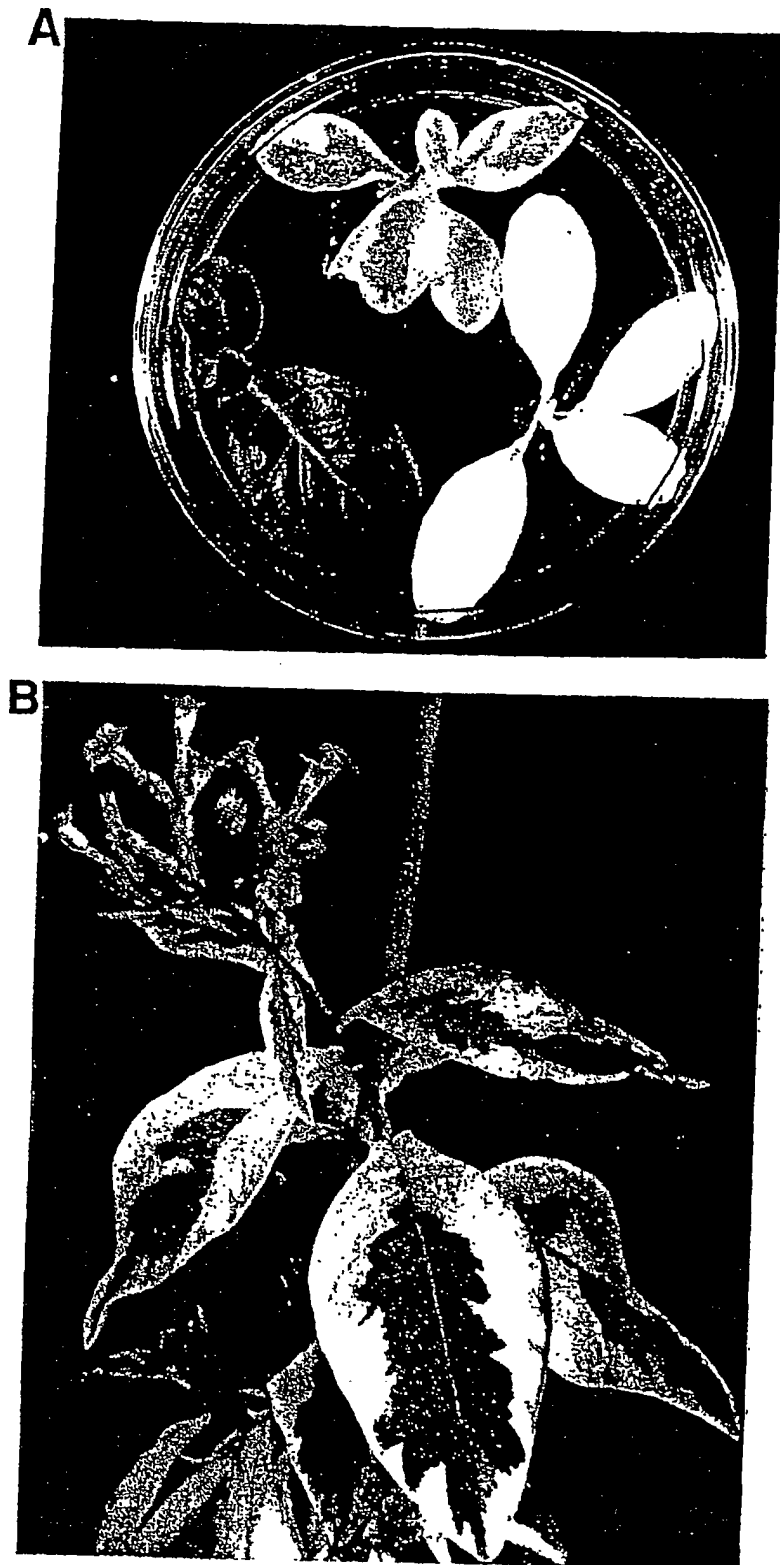
e) Regenerierung einer Pflanze aus der Zelle, die stabil transformierte Plastiden enthält.

Es folgen 13 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



Figur 1

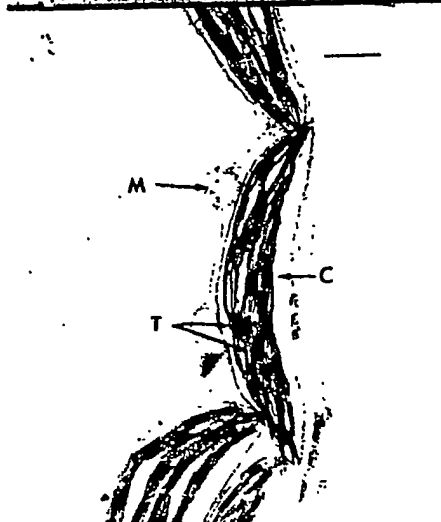


Figur 2

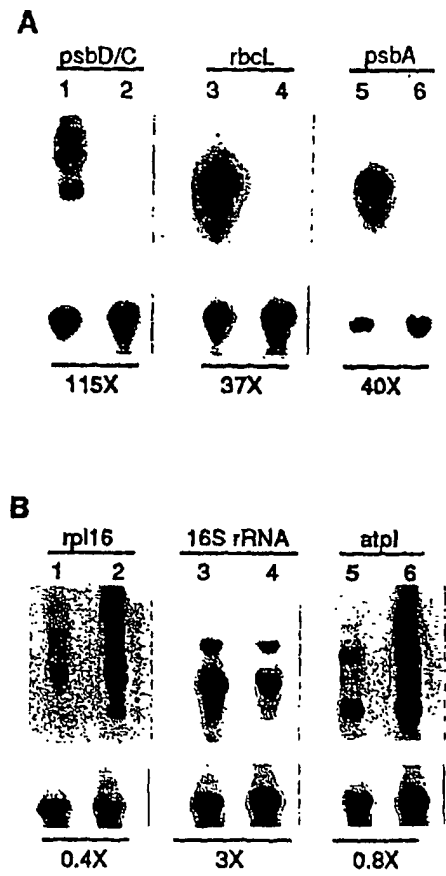
Fig. 3A



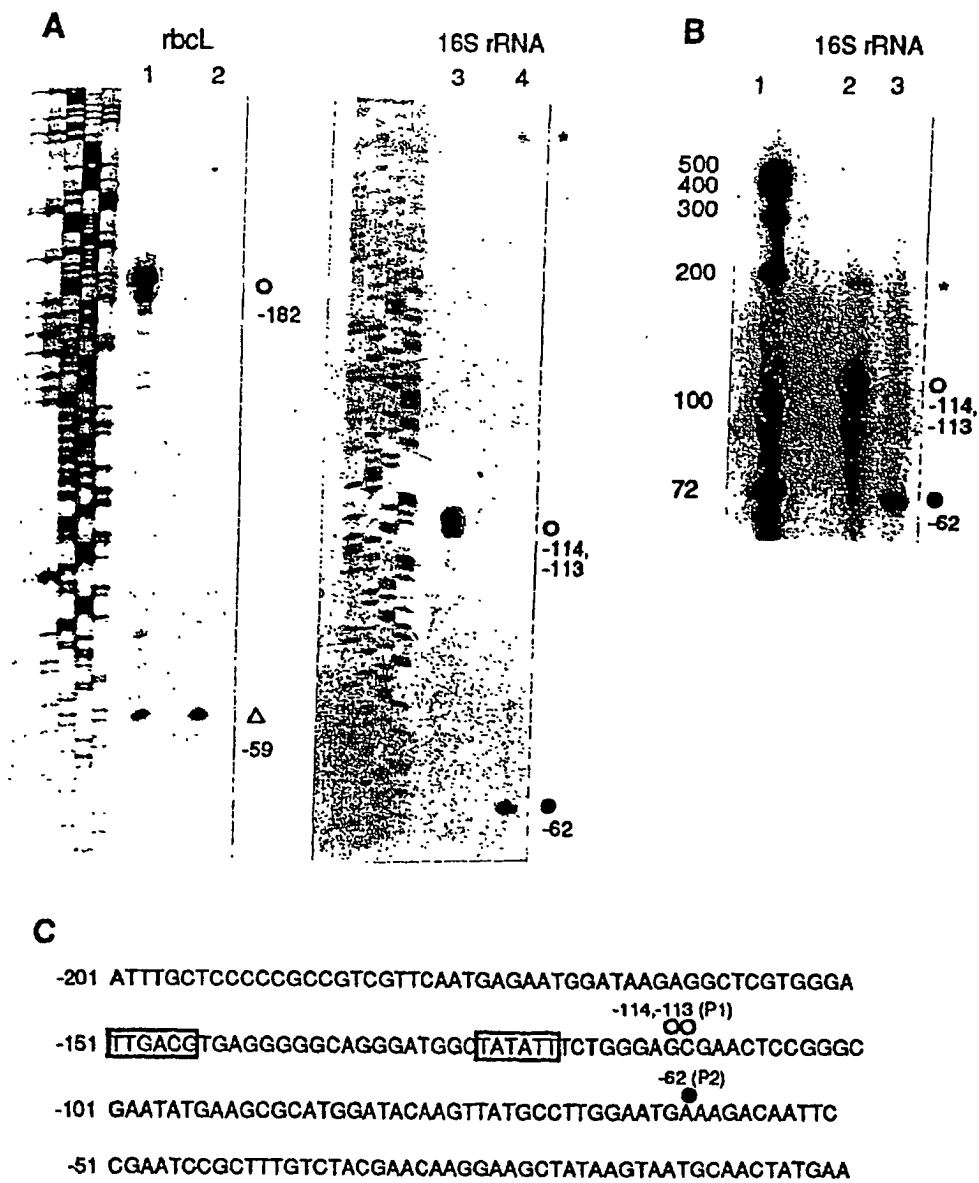
Fig. 3B



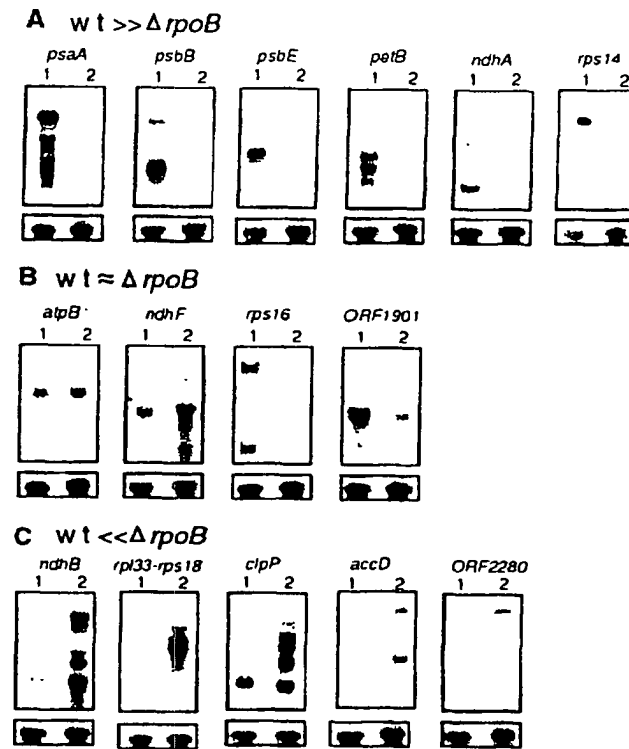
Figur 3



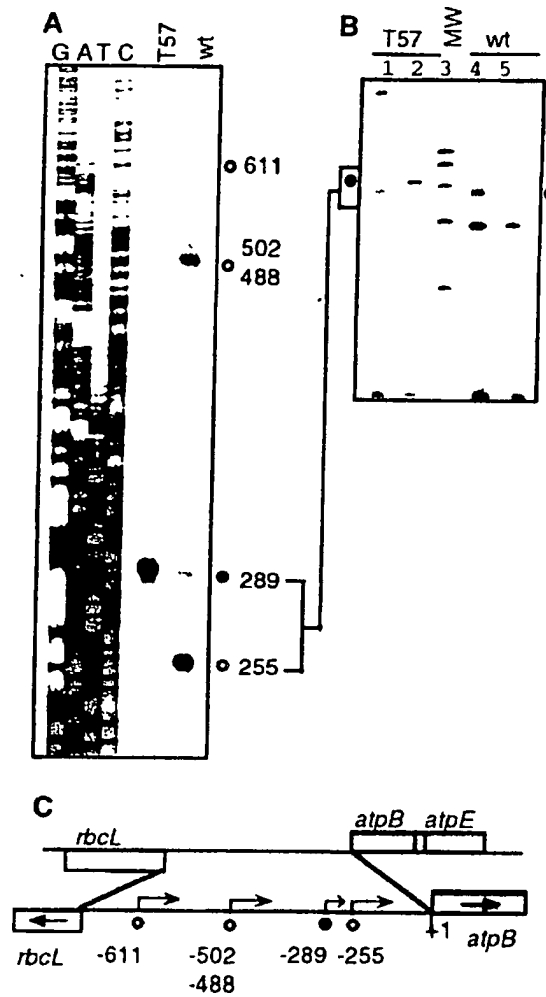
Figur 4



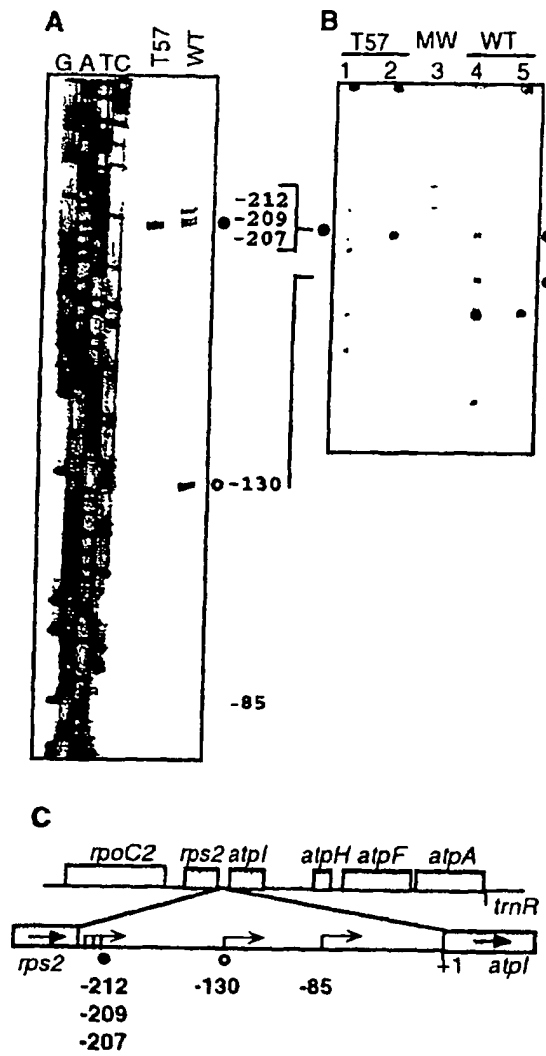
Figur 5



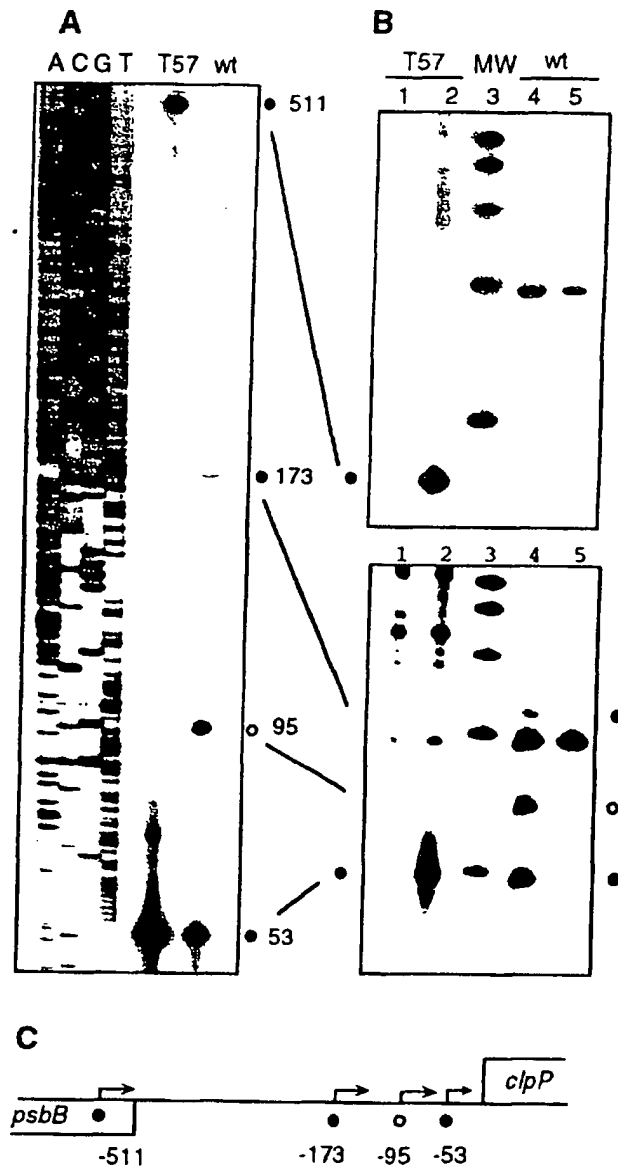
Figur 6



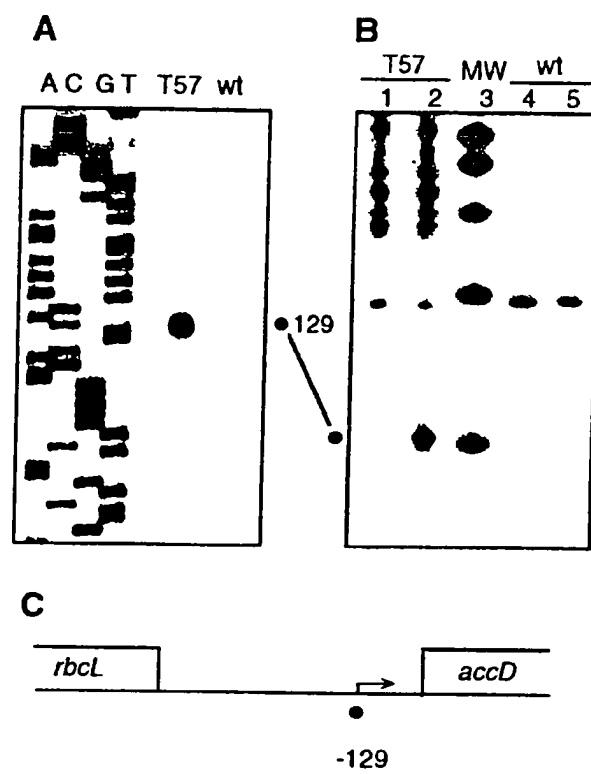
Figur 7



Figur 8



Figur 9



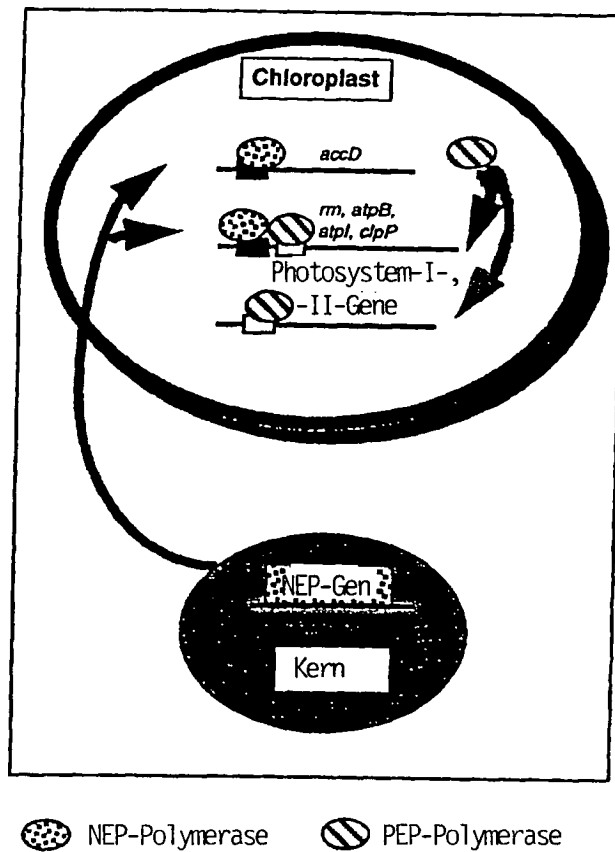
Figur 10

[illegible][illegible]

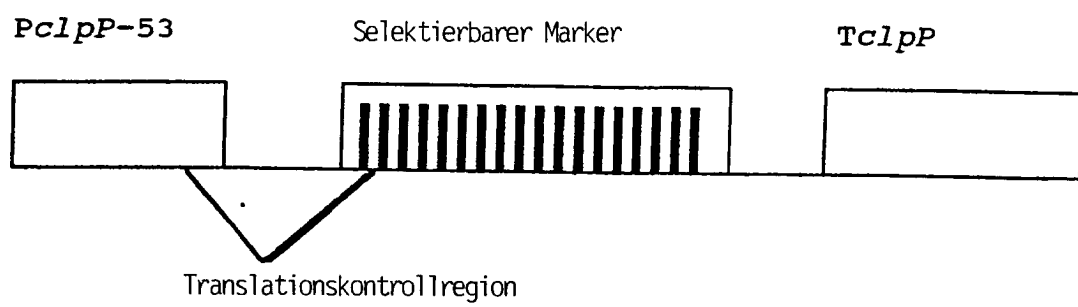
A T A G A T A A A . . .

AGACATAAATAATGTTACGTTTCCACCTCAA

Fig. 1



FIGUR 12



FIGUR 13