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

(10) **DE 694 34 786 T2** 2007.06.14

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 734 445 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 34 786.8**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/13190**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 903 539.5**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1995/015392**
(86) PCT-Anmeldetag: **21.11.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **08.06.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.10.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **05.07.2006**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.06.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 15/82*** (2006.01)
C12N 15/60 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
A01H 5/10 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

160117	**30.11.1993**	**US**
261661	**17.06.1994**	**US**

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

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

(72) Erfinder:
FALCO, Carl, Saverio, Arden, DE 19810, US;
KEELER, Jo, Sharon, Newark, DE 19711-2636, US;
RICE, Ann, Janet, Wilmington, DE 19803, US

(74) Vertreter:
derzeit kein Vertreter bestellt

(54) Bezeichnung: **CHIMAERE GENE UND VERFAHREN ZUR STEIGERUNG DES LYSIN-GEHALTS DER SAMEN VON MAIS, SOJA UND RAPS 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

TECHNISCHES GEBIET

[0001] Diese Erfindung betrifft drei chimäre Gene, wobei das erste Dihydrodipicolinsäuresynthase (DHDPS) kodiert, die gegen Inhibition durch Lysin unempfindlich ist und auf funktionsfähige Weise mit einer pflanzlichen Chloroplasttransitsequenz verknüpft ist, ein zweites, das ein lysinreiches Protein kodiert und ein drittes, das eine pflanzliche Lysinketoglutaratreduktase kodiert, die alle auf funktionsfähige Weise mit pflanzensamenspezifischen Regulationssequenzen verknüpft sind. Es werden Methoden zu ihrer Anwendung zum Herstellen erhöhter Niveaus von Lysin in den Samen transformierter Pflanzen bereitgestellt. Außerdem werden transformierte Mais-, Raps- und Sojabohnenpflanzen bereitgestellt, wobei die Samen Lysin in höheren Niveaus aufspeichern als untransformierte Pflanzen.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Der menschlichen Nahrung und Tierfutter, die von vielen Getreidearten deriviert sind, mangelt es an einigen der zehn essentiellen Aminosäuren, die in der tierischen Nahrung erforderlich sind. Beim Mais (Zea mays L.) ist Lysin die am stärksten einschränkende Aminosäure bezüglich der Ernährungserfordernisse vieler Tiere. Von anderen Nutzpflanzen, z.B. der der Sojabohne (Glycine max L.) oder Raps (Brassica napus) deriviertes Mehl wird als Zusatzmittel zu Tierfutter auf Maisbasis verwendet, um den Lysinmangel auszugleichen. Auch wird zusätzliches Lysin, das durch fermentieren von Mikroben hergestellt wird, als Ergänzung in Tierfutter verwendet. Eine Erhöhung des Lysingehalts von aus pflanzlichen Quellen deriviertem Mehl würde die Notwendigkeit des Ergänzens Getreidemischfutter mit mikrobiell hergestelltem Lysin reduzieren oder eliminieren.

[0003] Der Aminosäuregehalt von Samen wird hauptsächlich (90-99%) durch die Aminosäureszusammensetzung der Proteine im Samen und in geringerem Maße (1-10%) durch die Pools freier Aminosäure bestimmt. Die Menge an gesamtem Protein in Samen variiert zwischen ca. 10%, auf das Trockengewicht bezogen, bei Cerealien Getreiden und 20-40%, auf das Trockengewicht bezogen, bei Hülsenfrüchten. Ein Großteil der proteingebundenen Aminosäuren ist in den Samenspeicherproteinen enthalten, die während der Samenentwicklung synthetisiert werden und als Hauptnahrungsreserve auf das Keimen hin dienen. In vielen Samenkörnern machen die Speicherproteine 50% oder mehr des gesamten Proteins aus.

[0004] Um die Aminosäureszusammensetzung von Samen zu verbessern, wird die genetische Engineeringtechnologie zum Isolieren und Exprimieren von Genen für Speicherproteine in transgenen Pflanzen angewendet. Beispielsweise ist ein Gen aus der Paranuss für ein Samen-2S-Albumin, das aus 26% schwefelhaltigen Aminosäuren besteht, isoliert (Altenbach et al. (1987) Plant Mol. Biol. 8:239-250) und in den Samen von transformiertem Tabak unter der Kontrolle der Regulationssequenzen aus einem Bohnenphaseolin-Speicherprotein-Gen exprimiert worden. Die Speicherung von schwefelreichem Protein in den Tabaksamen führte zu einer bis zu 30%igen Erhöhung des Niveaus an Methionin in den Samen (Altenbach et al. (1989) Plant Mol. Biol. 13:513-522). Jedoch sind keine pflanzlichen Samenspeicherproteine, die ähnlich mit Lysin im Vergleich mit dem durchschnittlichen Lysingehalt von Pflanzenproteinen angereichert sind, bisher identifiziert worden, was diesen Ansatz daran hindert, zum Erhöhen von Lysin verwendet zu werden.

[0005] Ein alternativer Ansatz besteht darin, die Erzeugung und Speicherung von Lysin durch genetische Engineeringtechnologie zu erhöhen. Zusammen mit Threonin, Methionin und Isoleucin ist Lysin eine Aminosäure, die von Aspartat deriviert ist und die Regulierung der Biosynthese jedes Mitglied dieser Familie ist kompliziert, gegenseitig in Bezug stehend und, besonders bei Pflanzen, nicht klar verständlich. Die Regulierung des Stoffwechselflusses auf dem Stoffwechselweg scheint hauptsächlich durch Endprodukte in Pflanzen zu erfolgen. Der Aspartatfamilienweg wird ebenfalls an den Verzweigungspunktreaktionen reguliert. Bei Lysin ist das die Kondensation von Aspartyl-β-semialdehyd mit Pyruvat, die durch Dihydrodipicolinsäuresynthase (DHDPS) katalysiert ist.

[0006] Das E. coli dapA-Gen kodiert ein DHDPS-Enzym, das gegen Inhibition durch Lysin etwa 20 mal weniger empfindlich ist als ein typisches pflanzliches DHDPS-Enzym, z.B. Weizenkeim-DHDPS. Das E. coli dapA-Gen ist mit dem 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus und einer pflanzlichen Chloroplasttransitsequenz in Verbindung gebracht worden. Das chimäre Gen wurde durch Transformation in Tabakzellen eingeführt und es wurde gezeigt, dass es eine wesentliche Erhöhung der Niveaus an freiem Lysin in den Blättern hervorruft [Glassman et al. (1989) PCT-Patentanmeldung PCT/US89/01309, Shaul et al. (1992) Plant Jour. 2:203-209, Galili et al. (1992), EPA-Patentanmeldung 91119328.2, Falco, PCT/US93/02480 (internationale Veröffentlichung Nr. WO 93/19190)]. Jedoch wurde der Lysingehalt der Samen bei keiner der in diesen Studien

beschriebenen transformierten Pflanzen erhöht. Das gleiche chimäre Gen wurde auch in Kartoffelzellen eingeführt und führt zu einer geringen Erhöhung des freien Lysins in den Blättern, Wurzeln und Knollen regenerierter Pflanzen [Galili et al. (1992) EPA-Patentanmeldung 91119328.2, Perl et al. (1992) Plant Mol. Biol 19:815-823].

[0007] Falco, PCT/US93/02480 (internationale Veröffentlichung Nr. WO 93/19190) hat das E. coli dapA-Gen mit dem Bohnenphaseolinpromotor und einer pflanzlichen Chloroplasmansitsequenz verknüpft, um die Expression in den Samen zu erhöhen, beobachteten jedoch immer noch keine Erhöhung des Lysinniveaus in Samen. Wie oben bemerkt, wird der erste Schritt des Lysinbiosynthesewegs durch Aspartochinase (AK) katalysiert und dieses Enzym hat sich als ein wichtiges Target für die Regulierung bei vielen Organismen erwiesen. Falco hat einen Mutanten des E. coli lysC-Gens isoliert, das eine für das Lysin-Feedback unempfindliche AK kodiert und sie mit dem Bohnenphaseolinpromotor und einer pflanzlichen Chloroplasttransitsequenz verknüpft. Die Expression dieses chimären Gens in den Samen von transformiertem Tabak führte zu einer wesentlichen Erhöhung des Niveaus an Threonin, jedoch nicht an Lysin. Galili et al. (1992), EPA-Patentanmeldung 91119328.2 schlagen vor, dass das Transformieren von Pflanzen mit chimären Genen durch Verknüpfen samenspezifischer Promotoren mit einem pflanzlichen Chloroplasttransitsequenz/E. coli dapA-Gen und pflanzlichen Chloroplasttransitsequenz/mutantem E. coli lysC-Gen zu erhöhten Lysinniveaus in Samen führt. Falco, PCT/US93/02480 (internationale Veröffentlichung Nr. WO 93/19190) führte diesen Versuch durch Transformieren von Tabak mit einem Konstrukt aus, das beide chimäre Gene, das Bohnenphaseolinpromotor/pflanzliche Chloroplasmansitsequenz/E. Coli dapA-Gen und das Bohnenphaseolinpromotor/pflanzliche Chloroplasmansitsequenz/mutante E. Coli lysC-Gen enthält. Die gleichzeitige Exprimierung beider Gene hatte keine signifikante Wirkung auf den Lysingehalt der Samen. Jedoch ist beobachtet worden, dass ein Abbauprodukt von Lysin, nämlich α-Aminoadipinsäure, sich in den Samen ansammelt. Dies weist darauf hin, dass die Ansammlung von freiem Lysin in Samen aufgrund von Lysinkatabolismus verhindert wurde. Bei einem Versuch, die Biosynthesserate von Lysin zu erhöhen, isolierte Falco, PCT/US93/02480 (internationale Veröffentlichung Nr. WO/93/19190) das Corynebacterium glutamicum dapA-Gen, das ein gegen Lysin vollständig unempfindliches DHDPS-Enzym kodiert. Falco transformiert Tabak mit einem Konstrukt, das das chimäre Gen Bohnenphaseolinpromotor/pflanzliche Chloroplasttransitsequenz/Corynebacterium glutamicum dapA-Gen mit Bohnenphaseolinpromotor/pflanzlicher Chloroplasttransitsequenz/mutantem E. Coli lysC-Gen verknüpft enthält. Die gleichzeitige Exprimierung dieser beiden gegen Lysin unempfindlichen Enzyme hat immer noch keine signifikante Wirkung auf den Lysingehalt der Samen.

[0008] So ist es klar, dass das begrenzte Verständnis der Einzelheiten der Regulation des Lysinbiosynthesewegs in Pflanzen, insbesondere in Samen, die Anwendung genetischer Engineeringtechnologie zum Erhöhen des Lysingehalts ungewiss macht. Es ist bei den meisten Pflanzen nicht bekannt, ob Lysin in Samen synthetisiert oder zu den Samen von den Blättern transportiert wird. Außerdem ist wenig bekannt über die Speicherung oder den Katabolismus von Lysin in Samen. Da freie Aminosäuren nur einen geringen Bruchteil des gesamten Aminosäuregehalts von Samen ausmachen, muss die übermäßige Speicherung vielfach sein, um die gesamte Aminosäurezusammensetzung der Samen wesentlich zu beeinflussen. Außerdem sind die Wirkungen der übermäßigen Speicherung einer freien Aminosäure wie Lysin auf die Samenentwicklung und Lebensfähigkeit nicht bekannt.

[0009] Vor der hier beschriebenen Erfindung war keine Methode zum Erhöhen des Lysingehalts von Samen durch genetisches Engineering bekannt und es waren keine Beispiele von Samen mit erhöhten Lysinniveaus, die durch genetisches Engineering erhalten worden waren, bekannt.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0010] Diese Erfindung betrifft ein neuartiges chimäres Gen und Pflanzen, die durch Anwendung des neuartigen Gens transformiert worden sind, wobei ein Nukleinsäurefragment, das Dihydrodipicolinsäuresynthase kodiert, die gegen Inhibition durch Lysin unempfindlich ist, auf funktionsfähige Weise mit einer pflanzlichen Monokotchloroplasttransitsequenz und einer monokoten pflanzlichen samenspezifischen Regulationssequenz verknüpft ist. Bei einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Nukleinsäurefragment, das Dihydrodipicolinsäuresynthase kodiert, die Nukleotidsequenz, die in SEQ ID NO:3 gezeigt ist, die Dihydrodipicolinsäuresynthase aus Corynebacterium glutamicum kodiert. Bei besonders bevorzugten Ausführungsformen ist die pflanzliche Chloroplasttransitsequenz von einem Gen deriviert, das die kleine Untereinheit von Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase kodiert, und die samenspezifische Regulationssequenz stammt aus dem Gen, das die β-Untereinheit des Samenspeicherproteins Phaseolin aus dem Bohnen-Phaseolus vulgaris, dem Kunitz-Trypsin-Inhibitor-3-Gen von Glycine max. oder einem monokoten embryospezifischen Promotor, bevorzugt aus dem Globulin 1-Gen von Zea-Mais kodiert.

[0011] Die beschriebene Gene können beispielsweise zum Transformieren von Pflanzen, bevorzugt Maispflanzen, verwendet werden. Ebenfalls beansprucht sind Samen, die von den transformierten Pflanzen erhalten werden. Die Erfindung kann zur Erzeugung transformierter Pflanzen führen, wobei die Samen der Pflanzen Lysin bis zu einem Niveau aufspeichern, das mindestens zehn Prozent höher ist als bei Samen untransformierter Pflanzen, bevorzugt zehn bis vier hundert Prozent höher ist als bei untransformierten Pflanzen.

[0012] Die Erfindung betrifft des Weiteren eine Methode zum Erhalten einer Pflanze, bevorzugt einer Mais-, Raps- oder Sojabohnenpflanze, wobei die Samen der Pflanzen Lysin in einem 10 Prozent bis 400 Prozent höheren Niveau aufspeichern als die Samen von untransformierten Pflanzen, umfassend

(a) das Transformieren von Pflanzenzellen, bevorzugt Mais-, Raps- oder Sojabohnenzeilen, mit einem chimären Gen umfassend ein Nukleinsäurefragment, das Dihydrodipicolinsäuresynthase kodiert, die gegen Inhibition durch Lysin unempfindlich ist und funktionsfähig mit einer Pflanzenchloroplasmansitsequenz und einer pflanzensamenspezifischen Regulationssequenz verknüpft ist;

(b) das Regenerieren fruchtbarer reifer Pflanzen aus den aus Schritt (a) erhaltenen transformierten Pflanzenzellen unter Bedingungen, die zum Erhalten von Samen geeignet sind;

(c) das Screenen des Abkömmlingsamens aus Schritt (b) auf den Lysingehalt hin; und

(d) das Auswählen derjenigen Linien, deren Samen erhöhte Niveaus an Lysin enthalten. Transformierte Pflanzen, die durch diese Methode erhalten werden, sind ebenfalls beansprucht.

[0013] Die Erfindung betrifft zusätzlich ein Nukleinsäurefragment umfassend

(a) ein erstes chimäres Gen, wobei ein Nukleinsäurefragment, das Dihydrodipicolinsäuresynthase kodiert, die gegen Inhibition durch Lysin unempfindlich ist, auf funktionsfähige Weise mit einer Pflanzenchloroplasmansitsequenz und einer pflanzensamenspezifischen Regulationssequenz verknüpft ist und

(b) ein zweites chimäres Gen, wobei ein Nukleinsäurefragment, das ein lysinreiches Protein kodiert, wobei der Gewichtsprozentsatz von Lysin mindestens 15% beträgt, auf funktionsfähige Weise mit einer pflanzensamenspezifischen Regulationssequenz verknüpft ist und

[0014] Ebenfalls beschrieben ist ein Nukleinsäurefragment umfassend

(a) ein erstes chimäres Gen, wobei ein Nukleinsäurefragment, das Dihydrodipicolinsäuresynthase kodiert, die gegen Inhibition durch Lysin unempfindlich ist, auf funktionsfähige Weise mit einer Pflanzenchloroplasttransitsequenz und einer pflanzensamenspezifischen Regulationssequenz verknüpft ist; und

(b) ein zweites chimäres Gen, wobei ein Nukleinsäurefragment, das ein lysinreiches Protein kodiert, eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die ein Protein kodiert, das n Heptadeinheiten (defgabc) umfasst, wobei jedes Heptad entweder gleich oder verschieden ist, wobei:

n mindestens 4 beträgt;

a und d unabhängig aus der Gruppe ausgewählt werden bestehend aus Met, Leu, Val, Ile und Thr;

e und g unabhängig aus der Gruppe ausgewählt werden, bestehend aus den Säure/Basenpaaren Glu/Lys, Lys/Glu, Arg/Glu, Arg/Asp, Lys/Asp, Glu/Arg, Asp/Arg und Asp/Lys; und

b, c und f unabhängig irgendwelche Aminosäuren, mit Ausnahme von Gly oder Pro, sind und mindestens zwei Aminosäuren von b, c und f in jedem Heptad aus der Gruppe ausgewählt sind, bestehend aus Glu, Lys, Asp, Arg, His, Thr, Ser, Asn, Ala, Gln und Cys,

wobei das Nukleinsäurefragment funktionsfähig mit einer pflanzensamenspezifischen Regulationssequenz verknüpft ist.

[0015] Des Weiteren ist hier ein Nukleinsäurefragment beschrieben umfassend:

(a) ein erstes chimäres Gen, wobei ein Nukleinsäurefragment, das Dihydrodipicolinsäuresynthase kodiert, die gegen Inhibition durch Lysin unempfindlich ist, auf funktionsfähige Weise mit einer Pflanzenchloroplasttransitsequenz und einer pflanzensamenspezifischen Regulationssequenz verknüpft ist und

(b) ein zweites chimäres Gen, wobei ein Nukleinsäurefragment, das ein lysinreiches Protein kodiert, eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die ein Protein kodiert, das die Aminosäuresequenz $(MEEKLKA)_6(MEEKMKA)_2$ aufweist, funktionsfähig mit einer pflanzensamenspezifischen Regulationssequenz verknüpft ist.

[0016] Ebenfalls hier beansprucht sind Pflanzen, die verschiedene Ausführungsformen der beschriebenen ersten chimären Gene und zweiten chimären Gene enthalten und die beschriebenen Nukleinsäurefragmente und aus derartigen Pflanzen erhaltenen Samen.

[0017] Die Erfindung betrifft des Weiteren ein Nukleinsäurefragment umfassend

(a) ein erstes chimäres Gen, wobei ein Nukleinsäurefragment, das Dihydrodipicolinsäuresynthase kodiert, die gegen Inhibition durch Lysin unempfindlich ist, auf funktionsfähige Weise mit einer Pflanzenchloroplasttransitsequenz und einer pflanzensamenspezifischen Regulationssequenz verknüpft ist; und

(b) ein zweites chimäres Gen, wobei ein Nukleinsäurefragment, das eine Lysinketoglutaratreduktase kodiert, funktionsfähig in der Sense- oder Antisenseorientierung mit einer pflanzensamenspezifischen Regulationssequenz verknüpft ist. Ebenfalls beansprucht ist eine Pflanze, die in ihrem Genom dieses Nukleinsäurefragment umfasst und ein von einer derartigen Pflanze erhaltener Samen.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN UND BESCHREIBUNGEN DER SEQUENZEN

[0018] Die Erfindung kann aus der folgenden genauen Beschreibung und den beiliegenden Zeichnungen und den Sequenzbeschreibungen, die einen Teil dieser Anmeldung bilden, noch vollständiger verstanden werden.

[0019] Fig. 1 zeigt eine Alpha-Helix als Seiten- und Draufsichten.

[0020] **Fig.** 2 zeigt die End- (Fig. 2a) und Seiten- (Fig. 2b) Ansichten einer spiralenförmigen Alpha-Helixspiralstruktur.

[0021] **Fig.** 3 zeigt die chemische Struktur von Leucin und Methionin, wobei ihre ähnlichen Gestalten hervorgehoben werden.

[0022] Fig. 4 zeigt eine schematische Darstellung einer samenspezifischen Genexpressionskassette.

[0023] Fig. 5A zeigt eine Karte des binären Plasmidvektors pZSI99; Fig. 5B zeigt eine Karte des binären Plasmidvektors pFS926.

[0024] Fig. 6A zeigt eine Karte des Plasmidvektors pBT603; Fig. 6B zeigt eine Karte des Plasmidvektors pBT614.

[0025] Fig. 7 zeigt die Strategie für das Bilden eines Vektors (pSKS) zur Verwendung bei der Konstruktion und Expression der SSP-Gensequenzen.

[0026] Fig. 8 zeigt die Strategie für das Insertieren von Oligonukleotidsequenzen in die einzige Ear I-Stelle der Basengensequenz.

[0027] Fig. 9 zeigt die Insertion der Basengenoligonukleotide in die Nco I/EcoR I-Stellen von pSKS zur Bildung des Plasmids pSK6. Diese Basengensequenz wurde wie in Fig. 8 zum Insertieren der verschiedenen SSP-Kodierregionen an der einzigen Ear I-Stelle zur Bildung der aufgelisteten geklonten Segmente verwendet.

[0028] Fig. 10 zeigt die Insertion der 63 bp-„Segment"-Oligonukleotide, die zum Bilden sich nicht wiederholender Gelsequenzen zur Verwendung im Duplikationsschema in **Fig.** 11 verwendet werden.

[0029] **Fig.** 11 (A und B) zeigt die Strategie für das Multiplizieren sich nicht wiederholender Gen-„Segmente", bei denen in-frame-Fusionen verwendet werden.

[0030] Fig. 12 zeigt die Vektoren, die samenspezifische Promotor- und 3'-Sequenzkassetten enthalten. SSP-Sequenzen wurden in diese Vektoren unter Anwendung der Nco I und Asp718-Stellen insertiert.

[0031] Fig. 13 zeigt eine Karte des binären Plasmidvektors pZS97.

[0032] Fig. 14 zeigt eine Karte des Plasmidvektos pML63.

[0033] Fig. 15 zeigt eine Karte des Plasmidvektors pML102, der ein chimäres Gen trägt, wobei samenspezifische Regulationsseguenzen (aus dem Sojabohnen-Kunitz-Trypsininhibitor 3-Gen) mit einer Chloroplasttransitsequenz (aus der kleinen Untereinheit von Sojabohnenribulose-bisphosphatcarboxylase) und der Kodiersequenz für gegen Lysin unempfindliche Dihydrodipicolinsäuresynthase (das dapA-Gen von Corynebacterium glutamicum) verknüpft sind.
SEQ ID No: 1 und 2 wurden in Beispiel 1 als PKR-Primer für das Isolieren des Corynebacterium DapA-Gens verwendet.
SEQ ID No: 3 zeigt die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der kodierenden Region des Corynebacterium dapA-Gens vom Wildtyp, die gegen Lysin unempfindliche DHDPS-Säure, wie in Beispiel 1 beschrieben, kodiert.
SEQ ID No: 4 zeigt in Oligonukleotid, das in Beispiel 2, zum Bilden einer Nco I-Stelle am Translationsstartcodon des E. Coli dapA-Gens verwendet wird.

SEQ ID No: 5 zeigt die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der kodierenden Region des E. Coli lysC-Gens vom Wildtyp, die AKIII, wie in Beispiel 3 beschrieben kodiert.
SEQ ID No: 6 und 7 wurden in Beispiel 3 zum Bilden einer Nco I-Stelle am Translationsstartcodon des E. Coli lysC-Gens verwendet.
SEQ ID No: 8, 9, 10 und 11 wurden in Beispiel 4 zum Bilden einer Chloroplasttransitsequenz und der Verknüpfung der Sequenz mit den E. coli lysC-M4-, E. Coli dapA- und Corynebacterium dapA-Genen verwendet.
SEQ ID No: 12 und 13 wurden in Beispiel 4 zum Bilden einer Kpn I-Stelle, sofort auf den vom Translationsstopcodon des E. coli dapA-Gens hin verwendet.
SEQ ID No: 14 und 15 wurden in Beispiel 4 als PKR-Primer zum bilden einer Sojabohnenchloroplasttransitsequenz und Verknüpfung der Sequenz mit dem Corynebacterium dapA-Gen verwendet.
SEQ ID No: 16-92 stellen die Nukleinsäurefragmente und die Polypeptide dar, die sie kodieren, die zum Bilden chimärer Gene für lysinreiche synthetische Samenspeicherproteine verwendet werden, die für die Expression in den Samen von Pflanzen geeignet sind.
SEQ ID No: 93-98 wurden in Beispiel 12 zum Bilden einer Maischloroplasttransitsequenz verwendet.
SEQ ID No: 99 und 100 wurden in Beispiel 12 als PKR-Primer zum Bilden einer Maischloroplasttransitsequenz und einer Verknüpfung der Sequenz zum E. coli dapA-Gen verwendet.

[0034] Die Sequenzbeschreibungen enthalten die Einbuchstabenkode für Nukleotidsequenzschriftzeichen und die Dreibuchstabenkode für Aminosäuren, wie den IUPAC-IYUB-Standards entsprechend definiert, die in Nucleic Acids Research 13:3021-303 (1985) und im Biochemical Journal 219 (Nr. 2): 345-373 (1984) beschrieben sind, die hier summarisch eingefügt werden.

GENAUE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0035] Die unten aufgeführten Lehren beschreiben Nukleinsäurefragmente und Verfahrensweisen, die für das Erhöhen der Aufspeicherung von Lysin in den Samen tansformierter Pflanzen im Vergleich mit Lysinniveaus in untransformierten Pflanzen nützlich sind. Um die Aufspeicherung von freiem Lysin in den Samen von Pflanzen durch genetisches Engineering zu erhöhen, wurde eine Bestimmung durchgeführt, welche Enzyme auf diesem Weg den Weg in den Samen von Pflanzen regulieren. Um dies zu erreichen, wurden Gene, die Enzyme in dem Weg kodieren, von Bakterien isoliert. Intrazelluläre Lokalisationssequenzen und geeignete Regulationssequenzen für die Expression in den Samen von Pflanzen wurden zur Bildung chimärer Gene verknüpft. Die chimären Gene wurden dann durch Transformation in Pflanzen eingeführt und auf ihre Fähigkeit hin beurteilt, die Aufspeicherung von Lysin in Samen herbeizuführen. Die Expression von gegen Lysin unempfindlicher Dihydrodipicolinsäuresynthase (DHDPS) unter der Steuerung durch eine starken samenspezifischen Promotor hat sich als dahingehend erwiesen, die Niveaus von freiem Lysin in Mais-, Raps- und Sojabohnensamen 10- bis 100-fach zu erhöhen.

[0036] Es ist entdeckt worden, dass das volle Potential zum Aufspeichern von überschüssigem freiem Lysin in Samen durch Lysinkatabolismus reduziert wird. Es werden hier zwei alternative Möglichkeiten zum Verhindern des Verlusts von überschüssigem Lysin aufgrund von Katabolismus geboten. Beim ersten Ansatz wird der Lysinkatabolismus durch Reduktion der Aktivität des Enzyms Lysinketoglutaratreduktase (LKR) verhindert, die den ersten Schritt beim Lysinabbau katalysiert. Es wird eine Vorgehensweise zum Isolieren von pflanzlichen LKR-Genen bereitgestellt. Es werden chimäre Gene für die Expression von Antisense-LKR-RNA oder zum gleichzeitigen Unterdrücken von LKR in den Samen von Pflanzen gebildet. Das chimäre Gen wird dann mit dem chimären DHDPS-Gen verknüpft und beide gleichzeitig durch Transformation in Pflanzen eingeführt, oder die Gene werden durch Kreuzen von unabhängig transformierten Pflanzen mit jedem der chimären Gene zusammengebracht.

[0037] Beim zweiten Ansatz wird überschüssiges freies Lysin in einer Form eingearbeitet, die gegen Abbau unempfindlich ist, z.B. durch Einarbeiten desselben in ein Di-, Tri- oder Oligopeptid, oder ein lysinreiches Speicherprotein. Es wird das Design von Polypeptiden bereitgestellt, die in vivo exprimiert werden können, um als lysinreiche Samenspeicherproteine zu dienen. Gene, die lysinreiche synthetische Speicherprotein (SSP) kodieren, werden synthetisiert und es werden chimäre Gene, in denen die SSP-Gene mit geeigneten Regulationssequenzen zur Expression in den Samen von Pflanzen verknüpft sind, gebildet. Das chimäre SSP-Gen wird dann mit dem chimäre DHDPS-Gen verknüpft und beide werden durch gleichzeitige Transformation in Pflanzen eingeführt, oder die Gene werden durch Kreuzen von unabhängig transformierten Pflanzen mit jedem der chimären Gene zusammengebracht.

[0038] Eine Methode für das Transformieren von Pflanzen, bevorzugt Mais, Raps- und Sojabohnenpflanzen, wird hier gelehrt, wobei die dabei gebildeten Samen der Pflanzen mindestens zehn Prozent, bevorzugt zehn

Prozent bis 400 Prozent mehr Lysin als die Samen von untransformierten Pflanzen enthalten. Es werden hier als Beispiel transformierte Rapspflanzen mit im Vergleich mit untransformierten Pflanzen um 100% erhöhten Samenlysinniveaus, Sojapflanzen mit im Vergleich mit untransformierten Pflanzen um 400% erhöhten Samenlysinniveaus und transformierte Maispflanzen mit im Vergleich mit untransformierten Pflanzen um 130% erhöhten Samenlysinniveaus bereitgestellt.

[0039] Im Zusammenhang mit dieser Offenbarung werden eine Reihe von Begriffen verwendet. Der Begriff „Nukleinsäure", wie der hier verwendet wird, bezieht sich auf ein großes Molekül, das einstrangig oder doppelstrangig sein und aus Monomeren (Nukleotiden) bestehen kann, die einen Zucker, Phosphat oder ein Purin oder Pyrimidin enthalten. Ein „Nukleinsäurefragment" ist eine Fraktion eines vorgegebenen Nukleinsäuremoleküls. In Pflanzen höherer Ordnung ist die Desoxyribonukleinsäure (DNA) das genetische Material, während die Ribonukleinsäure (RNA) bei der Übertragung der Information in den DNA in Proteine involviert. Ein „Genom" ist der gesamte Körper von genetischem Material, das in jeder Zelle eines Organismus enthalten ist. Der Begriff „Nukleotidsequenz", bezieht sich auf ein Polymer von DNA oder RNA, das ein- oder doppelstrangig sein kann und gegebenenfalls synthetische, nichtnatürliche oder geänderte Nukleotidbasen enthält, die in der Lage sind, in DNA- oder RNA-Polymere eingearbeitet zu werden.

[0040] „Gen" bezieht sind auf ein Nukleinsäurefragment, das ein spezifisches Protein exprimiert, das Regulationssequenzen enthält, die der Kodierregion vorhergehen, (5'-nichtkodierend) und auf diese folgen (3'-nichtkodierend). „Natives" Gen bezieht sich auf das Gen, wie es in der Natur mit seinen eigenen Regulationssequenzen aufgefunden wird. „Chimäres" Gen bezieht sich auf ein Gen, das heterogene Regulations- und Kodiersequenzen umfasst. „Endogenes" Gen bezieht sich auf das native Gen, das normalerweise an seiner natürlichen Position im Genom vorzufinden ist. Ein „fremdes" Gen bezieht sich auf ein Gen, das normalerweise im Wirtsorganismus nicht aufzufinden ist, das jedoch durch Genübertragung eingeführt wird.

[0041] „Kodiersequenz" bezieht sich auf eine DNA-Sequenz, die für ein spezifisches Protein kodiert und die nichtkodierenden Sequenzen ausschließt.

[0042] „Initiationscodon" und Terminationscodon" beziehen sich auf eine Einheit von drei nebeneinanderliegenden Nukleotiden in einer Kodiersequenz, die jeweils die Initialion und den Kettenabbruch bei der Proteinsynthese (mRNA-Translation) spezifiziert. „Offenes Leseraster" bezieht sich auf die Aminosäuresequenz, die zwischen Translationsinitiations- und Abbruchcodons einer Kodiersequenz kodiert ist.

[0043] Geeignete „Regulationssequenzen", wie hier verwendet, bezieht sich auf Nukleotidsequenzen, die stromaufwärts (5'), innerhalb und/oder stromabwärts (3') von einer Kodiersequenz positioniert sind, die die Transkription und/oder Expression der Kodiersequenzen reguliert, potentiell in Verbindung mit dem Proteinbiosyntheseapparat der Zelle. Diese Regulationssequenzen umfassen Promotoren, Translations-Leader-Sequenzen, Transkriptionsabbruchsequenzen und Polyadenylationssequenzen.

[0044] „Promotor" bezieht sich eine auf DNA-Sequenz in einem Gen, die sich gewöhnlich stromaufwärts (5') ihrer Kodiersequenz befindet, die die Expression der Kodiersequenz durch Liefern der Erkennung bezüglich RNA-Polymerase und anderer Faktoren, die für eine richtige Transkription erforderlich sind, reguliert. Ein Promotor kann auch DNA-Sequenzen enthalten, die beim Binden von Proteinfaktoren involviert sind, die die Wirksamkeit der Transkriptionsinitiation als Reaktion auf physiologische oder Entwicklungsbedingungen regulieren. Er kann auch Enhancerelemente enthalten.

[0045] Ein „Enhancer" ist eine DNA-Sequenz, die die Promotoraktivität stimulieren kann. Es kann sich um ein inhärentes Element des Promotors oder ein heterologes Element handeln, das zum Verbessern des Niveaus und/oder der Gewebespezifizität eines Promotors eingeführt worden ist. „Konstitutive" Promotoren bezieht sich auf diejenigen, die die Genexpression in allen Geweben und zu allen Zeitpunkten dirigieren. „Organspezifische" oder „entwicklungsspezifische" Promotoren, wie hier auf diese Bezug genommen wird, sind diejenigen, die die Genexpression fast ausschließlich in spezifischen Organen wie beispielsweise Blättern oder Samen, oder in spezifischen Entwicklungsstufen in einem Organ, wie beispielsweise jeweils in der frühen oder späten Embryogenese, dirigieren.

[0046] Der Begriff „funktionsfähig verknüpft" bezieht sich auf Nukleinsäuresequenzen an einem einzigen Nukleinsäuremolekül, die so assoziiert sind, dass die Funktion einer derselben durch die andere beeinflusst wird. Beispielsweise wird ein Promotor funktionsfähig mit einem Strukturgen verknüpft, wenn er in der Lage ist, die Expression dieses Strukturgens zu beeinflussen (d.h., dass das Strukturgen unter der transkriptionellen Kontrolle des Promotors steht).

[0047] Der Begriff „Expression", wie er hier verwendet wird, soll die Erzeugung des Proteinprodukts, das durch ein Gen kodiert ist, bedeuten. Noch spezifischer bezieht sich „Expression" auf die Transkription und beständige Ansammlung der Sense-(mRNA) oder der Antisense-RNA, das von dem erfindungsgemäßen Nukleinsäurefragment bzw. den erfindungsgemäßen Nukleinsäurefragmenten deriviert ist, das bzw. die in Verbindung mit dem Proteinapparat der Zelle zu geänderten Niveaus des Proteinprodukts führt bzw. führen. „Antisense-Inhibition" bezieht sich auf die Erzeugung von Antisense-RNA-Transkripten, die in der Lage sind, die Expression des Zielproteins zu verhindern. „Überexpression" bezieht sich auf die Erzeugung eines Genprodukts in transgenen Organismen, die die Niveaus der Erzeugung in normalen oder nichttransformierten Organismen übersteigt. „Kosuppression" bezieht sich auf die Expression eines fremden Gens, das im Wesentlichen zum einem endogenen Gen homolog ist, was zur Unterdrückung der Expression sowohl des fremden als auch des endogenen Gens führt. „Geänderte Niveaus" bezieht sich auf die Erzeugung von Genprodukt(en) in transgenen Organismen in Mengen oder Anteilen, die von demjenigen normaler oder transformierter Organismen verschieden sind.

[0048] Die „3'-nichtkodierenden Sequenzen" bezieht sich auf den Anteil der DNA-Sequenz eines Gens, der ein Polyadenylationssignal und irgendein anderes Regulationssignal enthält, das in der Lage ist, die mRNA-Verarbeitung oder Genexpression zu beeinflussen.

[0049] Das Polyadenylationssignal ist gewöhnlich dadurch gekennzeichnet, dass es die Addition von Polyadenylsäuretrakten an das 3'-Ende des mRNA-Vorläufers beeinflusst.

[0050] „Translationsleadersequenz" bezieht sich auf denjenigen Anteil einer DNA-Sequenz eines Gens, der zwischen dem Promotor und der kodierenden Sequenz liegt, die in die RNA transkribiert ist und im vollständig verarbeiteten mRNA stromaufwärts (5') des Translationsstartcodons vorliegt. die Translationsleadersequenz kann das Verarbeiten des primären Transkripts zu mRNA, die mRNA-Stabilität oder -translationseffizienz beeinflussen.

[0051] „Reifes" Protein bezieht sich auf ein posttranslationell verarbeitetes Polypeptid ohne dessen Targetingsignal. „Vorläufer"-Protein bezieht sich auf das primäre Produkt der Translation von mRNA. Ein „Chloroplasttargetingsignal" ist eine Aminosäuresequenz, die in Verbindung mit einem Protein translatiert wird und dieses dem Chloroplast zuleitet. „Chloroplasttransitsequenz" bezieht sich auf eine Nukleotidsequenz, die ein Chloroplasttargetingsignal kodiert.

[0052] „Transformation" bezieht sich hier auf die Übertragung eines fremden Gens in das Genom eines Wirtsorganismus und dessen genetisch beständiges Erbtum. Beispiele von Pflanzentransformationsmethoden umfassen durch Agrobacterium vermittelte Transformation und teilchenbeschleunigte oder „Genpistolen"-Transformationstechnologie.

[0053] „Aminosäuren" bezieht sich hier auf die natürlich vorkommenden L-Aminosäuren (Alanin, Arginin, Aspartinsäure, Asparagin, Cystin, Glutamsäure, Glutamin, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Prolin, Phenylalanin, Serin, Threonin, Tryptophan und Valin). „Essentielle Aminosäuren" sind diejenigen Aminosäuren, die durch Tiere nicht synthetisiert werden können. Ein „Polypeptid" oder „Protein", wie es hier verwendet wird, bezieht sich auf ein Molekül, das aus Monomeren (Aminosäuren) besteht, die linear durch Amidbindungen (auch als Peptidbindungen bekannt) verknüpft sind.

[0054] „Synthetisches Protein" bezieht sich hier auf ein Protein, das aus Aminosäurensequenzen besteht, von denen nicht bekannt ist, dass sie in der Natur vorkommen. Die Aminosäuresequenz kann von einem Konsensus natürlich vorkommender Proteine deriviert sein oder sie kann vollständig neuartig sein.

[0055] „Primäre Sequenz" bezieht sich auf die Konnektivitätsordnung von Aminosäuren in einer Polypeptidkette ohne Bezugnahme auf die Konformation des Moleküls. Primäre Sequenzen werden üblicherweise vom Aminoende zum Carboxyende der Polypeptidkette hin geschrieben.

[0056] „Sekundäre Struktur" bezieht sich hier auf physikalisch-chemisch bevorzugte regelmäßige Rückgradkettenanordnungen einer Polypeptidkette ohne Bezugnahme auf Variationen der Seitenkettenidentitäten oder -konformationen. „Alpha-Helices", wie es hier verwendet wird, bezieht sich auf rechtsgedrehte mit ca. 3,6 Resten pro Helixdrehung. Eine „amphiphatische Helix" bezieht sich hier auf ein Polypeptid in einer Helixkonformation, wobei eine Seite der Helix überwiegend hydrophob und die andere Seite überwiegend hydrophil ist.

[0057] „Spiralenförmige Spirale" bezieht sich hier auf eine Ansammlung von zwei parallelen rechts gerichte-

ten Alpha-Helices, die umeinander herumgewunden sind unter Bildung einer linksgerichteten Superhelix.

[0058] „Salzbrücken" wie hier besprochen, beziehen sich auf Säure-Basepaare von beladenen Aminosäureseitenketten, die räumlich so angeordnet sind, dass eine elektrostatische Anziehungswechselwirkung zwischen zwei Teilen einer Polypeptidkette oder zwischen einer Kette und anderen aufrechterhalten wird.

[0059] „Wirtszelle" bedeutet, dass die Zelle mit dem eingeführten genetischen Material transformiert wird.

ISOLIERUNG VON DHDPS-GENEN

[0060] Das E. coli dapA-Gen (ecodapA) wurde als bacteriophager Lambda-Klon aus einer geordneten Bibliothek von 3400 sich überlappenden Segmenten von E. coli-DNA erhalten, die durch Kohara, Akiyame und Isono [Kohara et al. (1987) Cell 50:495-508] konstruiert wurde. Einzelheiten der Isolierung und Modifizierung von eoodapA sind in Beispiel 1 aufgeführt. Das ecodapA-Gen kodiert ein DHDPS-Enzym das der Inhibition durch Lysin gegenüber mindestens 20 mal weniger empfindlich ist als ein typisches Pflanzenenzym z.B. Weizen-DHDPS. Zum Zweck der vorliegenden Erfindung wird der Ausdruck „Inhibition durch Lysin 20 mal weniger empfindlich" als gegen Lysin unempfindlich bezeichnet.

[0061] Das Corynebacterium dapA-Gen (cordapA) wurde von genomer DNA aus dem ATCC-Stamm 13032 unter Anwendung der Polymerasekettenreaktion (PKR) isoliert. Die Nukleotidsequenz des Corynebacterium dapA-Gens ist veröffentlicht worden [Bonnassie et al. (1990) Nucleic Acids Res. 18:6421]. Aus dieser Sequenz war es möglich, Oligonukleotidprimer für die Polymerasekettenreaktion (PKR) zu konstruieren, die die Amplifikation eines das Gen enthaltenden DNA-Fragments erlauben und gleichzeitig einzige Restriktionsendonukleasestellen am Startcodon und gerade am Startcodon des Gens vorbei zufügen würden, um weitere, das Gen involvierenden Konstruktionen zu erleichtern. Die Einzellheiten des Isolierens des Corynebacterium dapA (cordapA) Gens sind in Beispiel 1 aufgeführt. Das cordapA-Gen kodiert ein bevorzugtes gegen Lysin unempfindliches DHDPS-Enzym, das durch das Vorliegen von 70 mM Lysin in der Enzymreaktionsmischung nicht beeinflusst wird.

[0062] Die Isolierung anderer DHDPS kodierender Gene ist in der Literatur beschrieben worden. Eine DHDPS aus Weizen kodierende cDNA [Kaneko et al. (1990) J. Biol. Chem. 265:17451-17455] und eine DHDPS aus Mais kodierende cDNA [Frisch et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 228:287-293] sind Beispiele pflanzlicher DHDPS-Gene, die isoliert und sequenziert worden sind. Die Pflanzengene kodieren gegen Lysin unempfindliche DHDPS-Enzyme vom Wildtyp. Jedoch erhielten Negrutui et al. [(1984) Theor. Appl. Genet. 68:11-20] zwei AEC-resistente Tabakmutanten, bei denen die DHDPS-Aktivität gegen Inhibition durch Lysin weniger empfindlich war als das Enzym vom Wildtyp. Das zeigt, dass diese Tabakmutanten DHDPS-Gene enthalten, die gegen Lysin widerstandsfähiges Enzym kodierten. Diese Gene könnten ohne Weiteres aus Tabakmutanten unter Anwendung der für das Isolieren der Weizen- oder Maisgene beschriebenen Methode entsprechend oder alternativ durch Anwendung der Weizen- oder Maisgene als heterologe Hybridisierungssonden isoliert werden.

[0063] Noch andere Gene, die DHDPS kodieren, können durch Anwendung entweder des E. coli dapA-Gens des cordapA-Gens oder eines der pflanzlichen DHDPS-Gene als DNA-Hybridisierungssonden isoliert werden. Als Alternative könnten andere Gene, die DHDPS kodieren, durch funktionelles Ergänzen eines E. coli dapA-Mutanten isoliert werden, wie zum Isolieren des cordapA-Gens [Yeh et al. (1988) Mol. Gen. Genet 212:105-111] und des Mais-DHDPS-Gens durchgeführt wurde.

KONSTRUKTION CHIMÄRER GENE FÜR DIE EXPRESSION EINER dapA-KODIERREGION IN PFLANZEN

[0064] Die Expression fremder Gene in Pflanzen ist gut eingeführt [De Blaere et al. (1987) Meth. Enzymol. 143:277-291]. Das richtige Expressionsniveau von dapA mRNA kann unter Umständen die Verwendung verschiedener chimärer Gene, bei denen verschiedene Promotoren verwendet werden, erforderlich machen. Derartige chimäre Gene können in Wirtspflanzen entweder zusammen in einem einzigen Expressionsvektor oder sequentiell unter Anwendung von mehr als einem Vektors übertragen werden. Eine bevorzugte Klasse heterologer Wirte für die Expression der Kodiersequenz der dapA-Gene sind eukaryontische Wirte, insbesondere die Zellen von Pflanzen höherer Ordnung. Besonders bevorzugt unter den Pflanzen höherer Ordnung und den von diesen derivierten Samen sind Rapssamen (Brassica napus, B. campestris) und Sojabohne (Glycine max).

[0065] Der Ursprung des Promotors, der zum Antreiben der Expression der Kodiersequenz ausgewählt wird, ist nicht kritisch, so lange er eine ausreichende Transkriptionsaktivität zur Erreichung der Erfindung durch Exprimieren translatierbarer mRNA für dapA-Gene in dem erwünschten Wirtsgewebe aufweist. Bevorzugte Pro-

motoren sind diejenigen, die die Expression des Proteins spezifisch in Samen erlauben. Dies kann besonders nützlich sein, das Samen die Hauptquelle von pflanzlichen Aminosäuren sind und auch da die samenspezifische Expression irgendwelche unerwünschte Auswirkung in Nichtsamenorganen vermeidet. Beispiele samenspezifischer Promotoren umfassen, sind jedoch nicht darauf beschränkt, die Promotoren von Samenspeicherproteinen. Die Samenspeicherproteine werden streng reguliert, indem sie fast ausschließlich in Samen auf hoch organspezifische und stufenspezifische Weise exprimiert werden [Higgins et al. (1984) Ann. Rev. Plant Physiol. 35:191-221; Goldberg et al. (1989) Cell 56:149-160; Thompson et al. (1989). Bio Essays 10:108-113]. Außerdem können verschiedene Samenspeicherproteine in verschiedenen Stufen der Samenentwicklung exprimiert werden.

[0066] Es gibt im Augenblick zahlreiche Beispiele der samenspezifischen Expression von Samenspeicherproteingenen in transgenen zweikeimblättrigen Pflanzen. Diese umfassen Gene aus zweikeimblättrigen Pflanzen für Bohnen-β-Phaseolin [Sengupta-Gopalan et al. (1985) proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3320-3324; Hoffman et al. (1988) Plant Mol. Biol 11:717-729], Bohnenlectin [Voellcer et al. (1987), EMBO J. 6:3571-3577], Sojabohnenlectin [Okamwo et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8240-8244], Sojabohnen-Kunitz-Trypsininhibitor [Perez-Grau et al. (1989) Plant Cell 1:095-1109], Sojabohnen-β-Conglycinin [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], Erbsenvicilin [Higgins et al. (1988) Plant Mol. Biol. 11:683-695], Erbsenconvicilin [Newbigin et al. (1990) Planta 180:461] Erbsenlegumin [Shirsat et al. (1989) Mol. Gen. Genetics 215:326], Raspssamennapin [Radke et al. (1988) Theor. Appl. Genet. 75:685-694] sowie Gene aus einkeimblättrigen Pflanzen wie beispielsweise bei Maiszein von 15 kD [Hoffman at 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 Weizenglutenin [Colot et al. (1987) EMBO J. 6:3559-3564]. Außerdem behalten Promotoren samenspezifischer Gene, die funktionsfähig mit heterologen Kodiersequenzen in chimären Genkonstrukten verknüpft sind, ebenfalls in ihr zeitliches und räumliches Expressionsmuster in transgenen Pflanzen bei. Derartige Beispiele umfassen Arabidopsis thaliana 2S-Samenspeicherproteingenpromotor zum Exprimieren von Enkephalinpeptiden in Arabidopsis- und B. napus-Samen [Vandekerckhove et al. (1989) Bio/Technology 7:929-932], Bohnenlectin- und Bohnen-β-Phaseolinpromotoren zum Exprimieren von Luciferase [Riggs et al (1989) Plant Sci. 63:47-57] und Weizengluteninpromotoren zum Exprimieren von Chloramphenicolacetyltransferase [Colot et al. (1987) EMBO J.6:3559-3564].

[0067] Von besonderem Nutzen beim Exprimieren des erfindungsgemäßen Nukleinsäurefragments sind die Promotoren verschiedener umfassend gekennzeichneter Samenspeicherproteingene, wie beispielsweise derjenigen für Bohnen-β-Phaseolin [Sengupta-Goplalan et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3320-3324; Hoffman et al. (1988) Plant Mol. Biol. 11:717-729], Sojabohnen-Kunitz-Trypsininhibitor [Jofuku et al. (1989) Plant Cell 1:1079-1093; Perez-Grau et al. (1989) Plant Cell 1:1095-1109], Sojabohnen-β-Conglycinin [Harada et al. (1989) Plant Cell 1:415-425] und Rapssamennapin [Radke et al. (1988) Theor. Appl. Genet. 75:685-694]. Promotoren von Genen für β-Phaseolin- und Sojabohnen-β-Conglycininspeicherprotein werden beim Exprimieren der dapA-mRNA in den Keimblättern in den mittleren bis späten Stufen der Samenentwicklung besonders nützlich sein.

[0068] Ebenfalls von besonderem Nutzen beim Exprimieren der erfindungsgemäßen Nukleinsäurefragmente werden die heterologen Promotoren aus verschiedenen umfassend gekennzeichneten Maissamenspeicherproteingenen, wie beispielsweise endospermspezifische Promotoren aus 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; Reina et al. (1990) Nukleic Acids Res. 18:6426-6426] und dem 19 kD-Zein [Marks et al. (1985) J. Biol. Chem. 260:16451-16459] sein. Von den relativen transkriptionellen Aktivitäten dieser Promotoren in Mais ist schon berichtet worden [Kodrzyek et al. (1989) Plant Cell 1:105-114], die die Basis für das Auswählen eines Promotors zur Verwendung in chimären Genkonstrukten für Mais bieten. Zum Exprimieren in Maisembryos kann der stark embryospezifische Promotor aus dem Globulin 1-(GLB1) Gen [Kriz (1989) Biochemical Genetics 27:239-251, Wallace et al. (1991) Plant Physiol. 95:973-975] verwendet werden.

[0069] Es ist geplant, dass das Einführen Enhancern oder enhancerähnlichen Elementen in andere Promotorenkonstrukte auch erhöhte Niveaus an primärer Transkription für dapA-Gene zum Erreichen der Erfindung bereitstellen wird. Diese würden Virusenhancer, wie beispielsweise derjenige, der in dem 355-Promotor aufzufinden ist [Odell et al. (1988) Plant Mol. Biol. 10:263-272], Enhancer aus den opinen Genen [Fromm et al (1989) Plant Cell 1:977-984] oder Enhancer aus irgendeiner anderen Quelle, die zu einer erhöhten Transkription führen, wenn sie in einen Promotor positioniert werden, der funktionsfähig mit dem erfindungsgemäßen Nukleinsäurefragment verknüpft ist.

[0070] Von besonderer Wichtigkeit ist das DNA-Sequenzelement, das aus dem Gen für die α'-Untereinheit von β-Conglycinin isoliert worden ist, das eine 40-fache samenspezifische Verbesserung bei einem konstitutiven Promotor hervorrufen kann [Chen et al. (1988) EMBO J. 7:297-302; Chen et al (1989) Dev. Genet. 10:112-122]. Ein Fachmann kann dieses Element ohne weiteres isolieren und es in die Promotorregion irgendeines Gens insertieren, um eine samenspezifisch verbesserte Expression mit dem Promotor in transgenen Pflanzen zu erhalten. Die Insertion eines derartigen Elements in irgendein samenspezifisches Gen, das zu verschiedenen Zeiten als das β-Conglyciningen exprimiert wird, führt zum Exprimieren in transgenen Pflanzen für eine längere Zeitspanne während der Samenentwicklung.

[0071] Irgendeine nichtkodierende 3'-Region, die in der Lage ist, ein Polyadenylationssignal bereitzustellen, und andere Regulationssequenzen, die eventuell für die richtige Expression der dapA-Kodierregionen erforderlich sind, können zum Erzielen der Erfindung verwendet werden. Dies würde das 3'-Ende von irgendeinem Speicherprotein, wie beispielsweise das 3'-Ende des Bohnenphaseolingens, das 3'-Ende des Sojabohnen-β-Conglyciningens, das 3'-Ende viraler Gene, wie beispielsweise das 3'-Ende 35S- oder des 19S-Blumenkohlmosaikvirustranskripts, das 3'-Ende der opinen Synthesegene, die 3'-Enden von Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase oder Chlorophyll a-/b-Bindungsprotein oder 3'-Endesequenzen von irgendeiner Quelle, derart einschließen, dass die angewendete Sequenz die nötige Regulationsinformation innerhalb ihrer Nukleinsäuresequenz liefert, um zur richtigen Expression der Kombination von Promotor/Kodierregion zu führen, mit der sie funktionsfähig verknüpft ist. Es gibt zahlreiche Beispiele im Stand der Technik, die die Nützlichkeit verschiedener nichtkodierender 3'-Regionen lehren [man vergleiche beispielsweise Ingelbrecht et al. (1989) Plant Cell 1:671-680].

[0072] DNA-Sequenzen, die für intrazelluläre Lokalisationsequenzen kodieren, können der dapA-Kodiersequenz zugegeben werden, falls dies für die richtige Exprimierung der Proteine zum Erreichen der Erfindung notwendig ist. Pflanzliche, biosynthetische Aminosäureenzyme sind dafür bekannt, dass sie in Chloroplasten lokalisiert sind und deshalb mit einem Chloroplasttargetingsignal synthetisiert werden. Bakterienproteine wie beispielsweise Corynebactrium DHDPS besitzen kein derartiges Signal. Eine Chloroplasttansitsequenz könnte aus diesem Grund an die dapA-Kodiersequenz fusioniert werden. Bevorzugte Chloroplasttransitsequenzen sind diejenigen der kleinen Untereinheit von Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylat, z.B. aus Sojabohnen [Berry-Lowe et al. (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:483-498] zur Verwendung in zweikeimblättrigen Pflanzen und aus Mais [Lebrun et al (1987) Nukleic Acids. Res. 15:4360] zur Verwendung in einkeimblättrigen Pflanzen.

EINFÜHRUNG CHIMÄRER dapA-GENE IN PFLANZEN

[0073] Verschiedene Methoden zum Einführen einer DNA-Sequenz (d.h. zum Transformieren) in eukaryontischene Zellen von Pflanzen höherer Ordnung stehen zur Verfügung (man vergleiche die EPA-Veröffentlichungen 0 295 959 A2 und 0 138 341 A1. Derartige Methoden umfassen diejenigen auf der Basis von Transformationsvektoren auf der Basis von Ti- und Ri-Plasmiden von Agrobacterium spp. Es wird besonders bevorzugt, den binären Typ dieser Vektoren zu verwenden. Von Ti derivierte Vektoren transformieren eine umfangreiche Reihe verschiedener Pflanzen höherer Ordnung, einschließlich einkeimblättrige und zweikeimblättrige Pflanzen, wie beispielsweise Sojabohnen, 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]

[0074] Zum Einführen in Pflanzen können die erfindungsgemäßen chimären Gene in binäre Vektoren, wie sie in den Beispielen 6-12 beschrieben sind, insertiert werden. Die Vektoren stellen einen Teil eines binären Ti-Plasmidvektorsystems [Bevan, (1984) Nucl. Acids. Res. 12:8711-8720] von Agrobacterium tumefaciens dar.

[0075] Andere Transformationsmethoden stehen den mit dem Stand der Technik vertrauten Fachleuten zur Verfügung, wie beispielsweise Direkt-Uptake von fremden DNA-Konstrukten [man vergleiche EPA-Veröffentlichung 0 295 959 A2] Elektroporationstechniken [man vergleiche Fromm et al. (1986) Nature (London) 319:791] oder ballistisches Hochgeschwindigkeitsbombardieren mit Metallteilchen, die mit den Nukleinsäurekonstrukten beschichtet sind [man vergleiche Kline et al. (1987) Nature (London) 327:70 und vergleiche die US-Patentschrift Nr. 4.945.050]. Nach dem Transformieren können die Zellen durch mit dem Stand der Technik vertraute Fachleute regeneriert werden.

[0076] Von besonderer Relevanz sind vor kurzem beschriebene Methoden zum Transformieren fremder Gene in handelsmäßig wichtige Anbaupflanzen wie Rapssamen [man vergleiche De Block et al. (1989) Plant Physiol. 91:694-701], Sonnenblumen [Everett et al. (1987) Bio/Technology 5:1201], Sojabohnen [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; EPA-Veröffentlichung 0 301 749 A2] und Mais [Gordon-Kamm et al. (1990) Plant Cell 2:603-618; Fromm et al. (1990) Biotechnology 8:833-839].

[0077] Zum Einführen in Pflanzen durch ballistisches Hochgeschwindigkeitsbombardieren können die erfindungsgemäßen chimären Gene in geeignete Vektoren, wie in Beispiel 6 beschrieben, insertiert werden.

EXPRIMIERUNG VON CHIMÄREN dapA-GENEN IN RAPS-, SOJABOHNEN UND MAISPFLANZEN

[0078] Zum Analysieren bezüglich der Expression des chimären dapA-Gens in Samen und bezüglich der Folgen der Expression des Aminosäuregehalts in den Samen kann ein Samenmehl wie in den Beispielen 5 oder 6 beschrieben oder durch irgendeine andere Methode zubereitet werden. Das Samenmehl kann, falls erwünscht, beispielsweise durch Hexanextraktion teilweise oder vollständig entfettet werden. Proteinextrakte können aus dem Mehl zubereitet und bezüglich ihrer DHDPS-Enzymaktivität analysiert werden. Als Alternative ist es möglich, immunologisch auf das Vorliegen des DHDPS-Proteins hin durch den mit dem Stand der Technik vertrauten Fachleuten allgemein bekannte Methoden geprüft werden. Fast alle Transformanten exprimierten das fremde DHDPS-Protein (man vergleiche Beispiele 5, 6 und 13). Zum Messen der Zusammensetzung der freien Aminosäure der Samen, können freie Aminosäuren von dem Mehl extrahiert und durch den mit dem Stand der Technik vertrauten Fachleuten bekannte Methoden analysiert werden (man vergleiche Beispiele 5 und 6 bezüglich geeigneter Vorgehensweisen).

[0079] Rapssamentransformanten, die DHDPS-Protein exprimieren, wiesen eine mehr als 100-fache Erhöhung des Niveaus an freiem Lysin in ihren Samen auf. Es bestand eine gute Korrelation zwischen Transformanten, die höhere Niveaus an DHDPS-Protein exprimieren, und denjenigen, die höhere Niveaus an freiem Lysin aufweisen. Unter den Transformanten fand keine größere Ansammlung von freiem Lysin aufgrund der Expression eines gegen Lysin unempfindlichen AK-Enzyms zusammen mit einer gegen Lysin unempfindlichen DHDPS, im Vergleich mit der Expression einer gegen Lysin unempfindlichen DHDPS als solcher statt. So ist die Exprimierung einer gegen Lysin unempfindlichen DHDPS in Samen im Falle von Rapssamen notwendig und ausreichend, um eine starke Erhöhung des freien Lysins zu verursachen. Ein hohes Niveau an α-Aminoadipinsäure, das einen Lysinkatabolismus anzeigt, wurde in allen den transformierten Linien bei erhöhten Niveaus an freiem Lysin beobachtet.

[0080] Um die gesamte Aminosäurezusammensetzung von reifem Rapssamensaatgut zu messen, wurde entfettetes Mehl wie in Beispiel 5 beschrieben analysiert. Relative Aminosäureniveaus in den Samen wurden als Prozentsätze von Lysin auf die gesamten Aminosäuren bezogen, verglichen. Die höchsten Expressionslinien zeigten eine fast zweifache Erhöhung des Lysinniveaus in den Samen, so dass Lysin ca. 12% der gesamten in den Samen enthaltenen Aminosäuren ausmacht.

[0081] Einundzwanzig von dreiundzwanzig Sojabohnentransformanten exprimierten das DHDPS-Protein. Die Analyse einzelner Samen dieser Transformanten zeigten eine ausgezeichnete Korrelation zwischen der Expression des GUS-Transformationsmarkergens und DHDPS in einzelnen Samen. Aus diesem Grund sind die GUS- und DHDPS-Gene an der gleichen Stelle im Sojabohnengenom integriert.

[0082] Es bestand eine ausgezeichnete Korrelation zwischen Transformanten, die das Corynebacteria DHDPS-Protein exprimieren und denjenigen, die höhere Niveaus an freiem Lysin aufweisen. 20-fache bis 120-fache Erhöhungen des freien Lysinniveaus wurden bei Samen beobachtet, die Corynebacteria DHDPS exprimieren.

[0083] Die Analysen der Niveaus an freiem Lysin in einzelnen Samen von Transformanten, in denen die Transgene sich an einer einzigen Stelle absonderten, zeigten, dass die Erhöhung des Niveaus an freiem Lysin in etwa einem Viertel der Samen signifikant stärker war. Da zu erwarten ist, dass ein Viertel der Samen für das Transgen homozygot sind, ist es wahrscheinlich, dass die Samen mit höherem Lysingehalt die Homozygoten sind. Des Weiteren weist dies darauf hin, dass das Erhöhungsniveau an freiem Lysin von der Kopiezahl des DHDPS-Gens abhängt. Aus diesem Grund könnten Lysinniveaus durch Herstellen von Hybriden von zwei verschiedenen Transformanten noch weiter erhöht werden und es könnten Abkömmlinge erhalten werden, die an beiden Transgen-Loci homozygot sind, wodurch die Kopiezahl des DHDPS-Gens von zwei auf vier erhöht wird.

[0084] Ein hohes Niveaus an Saccharopin, das auf den Lysinkatabolismus hindeutet, wurde in Samen beobachtet, die hohe Niveaus an Lysin enthielten. So sollte die Verhinderung des Lysinkatabolismus durch die Inaktivierung von Lysinketoglutaratreduktase die Ansammlung von freiem Lysin den Samen noch weiter erhöhen. Als Alternative würde das Einarbeiten von Lysin in ein Peptid oder lysinreiches Protein den Katabolismus

verhindern und zu einer Erhöhung der Ansammlung von Lysin in den Samen führen.

[0085] Die gesamten Lysinniveaus waren in Samen, die das Corynebacteria DHDPS-Protein exprimieren, signifikant erhöht. Es wurden Samen mit einer 10-260%-igen Erhöhung des Lysinniveaus im Vergleich mit untransformierter Kontrolle beobachtet. Die Expression von DHDPS zusammen mit einem gegen Lysin unempfindlichem Aspartokinaseenzym führte zu einer Erhöhung von Lysin von mehr als 400%. So enthalten diese Samen viel mehr Lysin als irgendein früherer Sojabohnensamen.

[0086] Die Expression des Corynebacterium DHDPS-Proteins, die entweder durch den Maisglobulin-1-Promotor zur Expression im Embryo oder den Maisglutelin 2-Promotor zur Expression in Endosperm angetrieben wird, wurde in den Maissamen beobachtet. Die Niveaus an freiem Lysin in den Samen stiegen von ca. 1,4% freier Aminosäure in Kontrollsamen auf 15-27% freier Aminosäure in Samen, die Corynebacterium DHDPS aus dem Globulin 1-Promotor exprimieren. Eine geringere Erhöhung des freien Lysins wurde in Samen beobachtet, die Corynebacterium DHDPS aus dem Glutelin 2-Promotor exprimieren. So ist es zum Erhöhen von Lysin eventuell besser, dieses Enzym im Embryo anstatt dem Endosperm zu exprimieren. Ein hohes Niveau an Saccharopin, das auf den Lysinkatabolismus hindeutet, wurde in Samen beobachtet, die hohe Niveaus an Lysin enthielten. Die erhöhte Ansammlung von freiem Lysin in Samen, die Corynebacterium DHDPS aus dem Globulin 1-Promotor exprimieren, reichte aus, um zu einer wesentlichen Erhöhung (35%-130%) des gesamten Lysingehalts der Samen zu führen.

ISOLIERUNG EINES PFLANZENLYSINKETOGLUTARAT-REDUKTASEGENS

[0087] Zum Akkumulieren höherer Niveaus an freiem Lysin, kann es wünschenswert sein, dem Lysinkatabolismus zu verhindern. Beweise zeigen an, dass Lysin in Pflanzen durch den Saccharopinweg katabolisiert wird. Der erste enzymatische Beweis des Vorliegens dieses Wegs bestand aus der Erfassung der Aktivität der Lysinketoglutaratreduktase (LKR) im unreifen Endosperm sich entwickelnder Maissamen [Aruda et al. (1982) Plant Physiol. 69:988-989]. LKR katalysiert den ersten Schritt des Lysinkatabolismus, nämlich die Kondensation von L-Lysin mit einem α-Ketoglutarat zu Saccharopin unter Anwendung von NADPH als Co-Faktor. Die LKR-Aktivität erhöht sich stark vom Einsetzen der Endospermentwicklung in Mais an, erreicht einen Höhepunkt ca. 2 Tage nach dem Bestäuben und nimmt dann ab [Arruda et al. (1983) Phytochemicals 22:2687-2689]. Um den Katabolismus von Lysin zu verhindern, wäre es wünschenswert, die LKR-Expression oder -aktivität zu reduzieren oder eliminieren. Dies ließe sich durch Klonieren der LKR, Zubereiten eines chimären Gens zum gleichzeitigen Unterdrücken von LKR oder Zubereiten eines chimären Gens zum Exprimieren von Antisense-RNA für LKR und Einführen des chimären Gens in Pflanzen durch Transformation erreichen.

[0088] Mehrere Methoden zum Klonieren eines pflanzlichen LKR-Gens stehen den mit dem Stand der Technik vertrauten Fachleuten zur Verfügung. Das Protein kann aus Maisendosperm, wie bei Brochetto-Braga et al. [(1992) Plant Physiol. 98:1139-1147 beschrieben] gereinigt und zum Züchten von Antikörpern verwendet werden. Die Antikörper können dann zum Screenen einer cDNA-Expressionsbibliothek für LKR-Klone verwendet werden. Als Alternative kann das gereinigt Protein zum Bestimmen der Aminosäuresequenz am Aminoende des Proteins oder aus Protease derivierten internen Peptidfragmenten verwendet werden. Es können entartete Oligonukleotidsonden auf der Basis der Aminosäuresequenz zubereitet und zum Screenen einer pflanzlichen cDNA- oder genomischen DNA-Bibliothek durch Hybridisierung verwendet werden. Bei einer anderen Methode wird ein E. coli-Stamm verwendet, der nicht in der Lage ist, in einem synthetischen Medium, das 20 µg/ml L-Lysin enthält, zu wachsen. Die Expression von LKR-cDCNA voller Länge in diesem Stamm macht die Wachstumsinhibition durch Reduzieren der Lysinkonzentration rückgängig. Die Konstruktion eines geeigneten E. coli-Stamms und dessen Verwendung zum Auswählen von Klonen aus einer eine pflanzliche cDNA-Bibliothek, die zu gegen Lysin widerstandsfähigem Wachstum führt, ist in Beispiel 7 beschrieben.

[0089] Um die Expression des LKR-Gens in transformierten Pflanzen zu blockieren, kann ein chimäres Gen, das für die gleichzeitige Unterdrückung von LKR konstruiert ist, durch Verknüpfen des LKR-Gens oder -Genfragments mit irgendeiner der oben beschriebenen Pflanzenpromotorsequenzen konstruiert werden (US-Patent Nr. 5231020). Als Alternative kann ein chimäres Gen, das zu Exprimieren von Antisense-RNA für das gesamte oder einen Teil des LKR-Gens konstruiert ist, durch Verknüpfen des LKR-Gens oder -Genfragments in Umkehrorientierung mit irgendeiner der oben beschriebenen pflanzlichen Promotorsequenzen konstruiert werden (Europäische Patentanmeldung Nr. 84112647.7). Entweder das Kosuppresions- oder chimäre Antisense-Gen könnte durch Transformation in Pflanzen eingeführt werden. Transformanten, bei denen die Expression des endogenen LKR-Gens reduziert oder eliminiert ist, werden ausgewählt.

[0090] Bevorzugte Promotoren für die chimären Gene wären samenspezifische Promotoren. Für Sojabohnen-, Raps- und andere zweikeimblättrige Pflanzen wären stark samenspezifische Promotoren aus einem Bohnenphaseolin-Gen, einem Sojabohnen-β-Conglycinin-Gen, Glycinin-Gen, Kunitz-Trypsin-Inhibitor-Gen oder Rapssamennapin-Gen bevorzugt. Für Mais und andere einkeimblättrige Pflanzen würde eine stark endospermspezifischer Promotor, d.h. der 10 kD- oder 27 kD Zein-Promotor bevorzugt.

[0091] Transformierte Pflanzen, die irgendeines der chimären LKR-Gene enthalten, können durch die oben beschriebenen Methoden erhalten werden. Um transformierte Pflanzen zu erhalten, die ein chimäres Gen für die Kosuppression von LKR oder Antisense-LKR, sowie ein chimäres Gen exprimieren, das gegen Lysin unempfindliche DHDPS kodiert, könnte das Kosuppressions- oder Antisense-LKR-Gens mit dem chimären Gen verknüpft werden, das das gegen Lysin unempfindliche DHDPS kodiert, und die beiden Gene könnten durch Transformation in Pflanzen eingeführt werden. Als Alternative könnte das chimäre Gen für die Kosuppression von LKR oder Antisense-LKR in vorher transformierte Pflanzen eingeführt werden, die gegen Lysin unempfindliches DHDPS exprimieren, oder das Kosuppressions- oder Antisens-LKR-Gen könnte in normale Pflanzen eingeführt und die dabei erhaltenen Transformanten könnten mit Pflanzen gekreuzt werden, die gegen Lysin unempfindliche DHDPS exprimieren.

KONSTRUKTION VON LYSINREICHEN POLYPEPTIDEN

[0092] Es kann wünschenswert sein, die hohen Niveaus an gebildetem Lysin in eine Form umzuwandeln, die gegen Abbau unempfindlich ist, d.h. durch Einbauen desselben in ein Bi- Tri- oder Oligopeptid oder ein lysinreiches Speicherprotein. Es sind keine natürlichen lysinreichen Proteine bekannt.

[0093] Eine Ausgestaltung dieser Erfindung besteht aus der Entwicklung von Polypeptiden, die in vivo exprimiert werden können, um als lysinreiche Samenspeicherproteine zu dienen. Polypeptide sind lineare Polymere von Aminosäuren, wobei die α-Carboxylgruppe einer Aminosäure kovalent an die α-Aminogruppe der nächsten Aminosäure in der Kette gebunden ist. Nichtkovalente Wechselwirkungen zwischen den Resten der Kette und mit dem umgebenden Lösungsmittel bestimmen die endgültige Konformation des Moleküls. Diejenigen Fachleute, die mit dem Stand der Technik vertraut sind, müssen elektrostatische Kräfte, Wasserstoffbindungen, Van-der-Waals-Kräfte, hydrophobe Wechselwirkungen und konformationelle Vorlieben für einzelne Aminosäurereste im Design einer beständigen gefalzten Peptidkette in Betracht ziehen [vergleiche beispielsweise: Creighton (1984) Proteins, Structures and Molecular Properties (Proteine, Strukturen und molekulare Eigenschaften), W. H. Freeman and Company, New York, Seite 133-197 oder Schulz et al. (1979) Principles of Protein Structure (Prinzipien der Proteinstruktur), Springer Verlag, New York, Seite 27-45]. Die Anzahl von Wechselwirkungen und ihre Komplexität weist daraufhin, dass der Designvorgang durch Verwendung natürlicher Proteinmodelle, soweit möglich, unterstützt werden kann.

[0094] Die synthetischen Speicherproteine (SSP), die in dieser Erfindung verkörpert sind, werden so gewählt, dass es sich um Polypeptide mit dem Potential handelt, mit Bezug auf die durchschnittlichen Proteinniveaus in Pflanzensamen lysinangereichert zu sein. Lysin ist bei physiologischem pH-Wert eine geladene Aminosäure und aus diesem Grund am häufigsten auf der Oberfläche von Proteinmolekülen aufzufinden [Chotia (1976) Journal of Molecular Biology 105:1-14]. Um den Lysingehalt zu maximieren, haben die Anmelder für die in dieser Erfindung verkörperten synthetischen Speicherproteine eine Molekulargestalt mit einem hohen Oberflächen-zu-Volumenverhältnis gewählt. Die Alternativen bestanden darin, entweder die allgemeine kugelförmige Gestalt der meisten Proteine unter Bildung einer stabähnlichen verlängerten Struktur zu strecken oder die kugelförmige Gestalt zu einer scheibenähnlichen Struktur abzuflachen. Die Anmelder haben die erstere Konfiguration gewählt, da es mehrere natürliche Modelle für lange stabförmige Proteine in der Klasse fibröser Proteine gibt [Creighton (1984) Proteins, Structures and Molecular Properties (Proteine, Strukturen und Molekulareigenschaften), W.H. Freeman and Company, New York, Seite 191].

[0095] Gewundene Spiralen stellen eine eingehend studierte Untergruppe der Klasse von fibrösen Proteinen dar [man vergleiche Cohen et al. (1986) Trends Biochem. Sci. 11:235-248]. Natürliche Beispiele sind in Form von α-Keratinen, Paramyosin, leichtem Meromyosin und Tropomyosin zu finden. Die Proteinmoleküle bestehen aus zwei parallelen α-Helices, die in Form einer linksdrehenden Superspirale umeinander herumgewickelt sind. Der Wiederholungsabstand dieser Superspirale beträgt 140 Å (im Vergleich mit einem Widerholungsabstand von 4,5 Å für eine Windung der einzelnen Helices. Die Superhelix verursacht eine geringe Verzerrung (10 °) zwischen den Achsen der beiden einzelnen α-Helices.

[0096] Bei einer gewundenen Spirale liegen 3,5 Reste pro Umdrehung der einzelnen Helices vor, was zu genau 7 Restperiodizitäten bezüglich der Superhelixachse führt (vergleiche **Fig. 1**). Aus diesem Grund besetzt

jede siebte Aminosäure in der Polypeptidkette eine äquivalente Position bezüglich der Helixachse. Die Anmelder bezeichnen die sieben Positionen in dieser Heptat-Einheit der Erfindung als (defgabc), wie in den Fig. 1 und Fig. 2a gezeigt. Dieses entspricht der in der Literatur der gewundenen Spiralen üblichen Gepflogenheit.

[0097] Die a- und d-Aminosäuren des Heptads folgen einem 3,4-Wiederholungsmuster in der primären Sequenz und fallen auf eine Seite einer einzelnen Alpha-Helix (vergleiche Fig. 1). Wenn die Aminosäuren auf einer Seite einer Alpha-Helix alle nicht polar sind, so ist diese Seite der Helix hydrophob und wird sich mit anderen hydrophoben Flächen, beispielsweise der nichtpolaren Seite anderer ähnlicher Helices assoziieren. Eine gewundene Spiralenstruktur entsteht, wenn zwei Helices sich derart dimerisieren, dass ihre hydrophoben Seiten aufeinander aufgerichtet sind (man vergleiche Fig. 2a).

[0098] Die Aminosäuren auf den Außenseiten der Komponente Alpha-Helices (b, c, e, f, g) sind in natürlichen gewundenen Spiralen dem erwarteten Muster ausgesetzter oder verborgener Resttypen entsprechend in kugelförmigen Proteinen gewöhnlich polar [Schulz et al. (1979) Principles of Protein Structure (Prinzipien der Proteinstruktur). Springer Verlag, New York, Seite 12; Talbot et al. (1982) Acc. Chem. Res. 15:224-230; Hodges et al. (1981) Journal of Biological Chemistry 256:1214-1224]. Es können manchmal geladene Aminosäure aufgefunden werden, die Salzbrücken zwischen den Positionen e und g' oder den Positionen g und e' auf der gegenüberliegenden Kette bilden (vergleiche Fig. 2a).

[0099] So werden zwei amphiphatische Helices, wie diejenige, die in Fig. 1 gezeigt ist, durch eine Kombination von hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den a, a', d und d'-Resten und durch Salzbrücken zwischen den e und g'- und/oder g und e'-Resten zusammengehalten. Durch Zusammenpacken der hydrophoben Reste in der Superspirale werden die Ketten „im Register" gehalten. Für kurze Polypeptidketten, die nur einige wenige Windungen der Komponente Alpha-Helixketten umfassen, kann die 10 °-Verzerrung zwischen den Helixachsen ignoriert und die beiden Ketten als parallel behandelt werden (wie in Fig. 2a gezeigt).

[0100] In der Literatur ist von einer Anzahl synthetischer gewundener Spiralen berichtet worden (Lau et al (1984) Journal of Biological Chemistry 259:13253-13261; Hodges et al. (1988) Peptide Research 1:19-30; DeGrado et al. (1989) Science 243:622-628; O'Neil et al. (1990) Science 250:646-651]. Obwohl diese Polypeptide größenmäßig unterschiedlich sind, haben Lau et al. gefunden, dass 29 Aminosäuren für die Dimerisierung unter Bildung der gewundenen Spiralenstruktur ausreichten [Lau et al. (1984) Journal of Biological Chemistry 259:13253-13261]. Die Anmelder haben bei dieser Erfindung Polypeptide als 28-Rest- und größere Ketten aus Gründen der Konformationsstabilität konstruiert.

[0101] Die erfindungsgemäßen Polypeptide sind so konstruiert, dass sie sich in wäßrigen Umgebungen mit einem gewundenen Spiralenmotif dimerisieren. Die Anmelder haben eine Kombination von hydrophoben Wechselwirkungen und elektrostatischen Wechselwirkungen zum Stabilisieren der gewundenen Spiralenkonformation verwendet. Die meisten nichtpolaren Reste sind auf die a- und d-Position beschränkt, was einen hydrophoben Streifen bildet, der zur Achse der Helix parallel liegt. Das ist die Dimerisierungsseite. Die Anmelder haben große voluminöse Aminosäuren dieser Seite entlang vermieden, um die sterische Störung bei der Dimerisierung zu minimieren und die Bildung der beständigen gewundenen Spiralenstruktur zu erleichtern.

[0102] Trotz kürzlicher Berichte in der Literatur, die darauf hindeuteten, das Methionin an den Positionen a und d durch gewundene Spiralen in der Leucin-Zipper-Untergruppe destabilisiert wird [Landschulz et al. (1989) Science 243:1681-1688 und Hu et al. (1990) Science 250:1400-1403] haben die Anmelder es gewählt, Leucin auf der hydrophoben Seite der SSP-Polypeptide durch Methioninreste zu ersetzen. Methionin und Leucin weisen eine ähnliche Molekulargestalt auf (**Fig.** 3). Die Anmelder haben gezeigt, dass irgendeine Destabilisierung der gewundenen Spirale, die durch Methionin in dem hydrophoben Kern hervorgerufen werden kann, in Sequenzen ausgeglichen zu sein scheint, wo die Bildung von Salzbrücken (e-g' und g-e') an allen möglichen Positionen innerhalb der Helix erfolgt (d.h. zweimal pro Heptad).

[0103] Bis zu dem Grad, in dem es mit dem Ziel des Schaffens eines mit Lysin angereicherten Polypeptids vereinbar ist, haben die Anmelder die unausgeglichenen Ladungen im Polypeptid minimiert. Dies kann dazu beitragen, unerwünschte Wechselwirkungen zwischen den synthetischen Speicherproteinen und anderen pflanzlichen Proteinen zu verhindern, wenn die Polypeptide in vivo exprimiert werden.

[0104] Die erfindungsgemäßen Polypeptide sind so konstruiert, dass sie sich spontan zu einer definierten, konformationell beständigen Struktur, der gewundenen Alpha-Helixspirale, mit minimalen Restriktionen auf der primären Sequenz falzen. Das erlaubt es, synthetische Speicherproteine spezielle auf die spezifischen Anforderungen der Endanwender zuzuschneiden. Irgendeine Aminosäure kann mit einer Frequenz von bis zu einem

je sieben Resten unter Anwendung der b-, c- und f-Positionen in der Heptadwiederholungseinheit eingearbeitet werden. Die Anmelder weisen darauf hin, dass bis zu 43% einer essentiellen Aminosäure aus der Gruppe von Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Threonin und Valin eingearbeitet werden können und dass bis zu 14% der essentiellen Aminosäuren aus der Gruppe Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin in die erfindungsgemäßen synthetischen Speicherproteine eingearbeitet werden können.

[0105] In den SSP sind nur Met, Leu, Ile, Val oder Thr im hydrophoben Kern positioniert. Des Weiteren sind die e-, g-, e'- und g'-Positionen in den SSP derart eingeschränkt unterworfen, dass eine elektrostatische Anziehungswechselwirkung immer an diesen Positionen zwischen den beiden Polypeptidketten in einem SSP-Dmer erfolgt. Dadurch werden die SSP-Polypeptide als Dimere stabiler.

[0106] So stellen die neuartigen synthetischen Speicherproteine, die in dieser Erfindung beschrieben sind, eine spezifische Untergruppe möglicher gewundener Spiralenpolypeptide dar. Nicht alle Polypeptide, die in einer wäßrigen Lösung eine amphipatische Alpha-Helixkonformation annehmen, sind für die oben beschriebenen Anwendungen geeignet.

[0107] Folgende Regeln, die von den Arbeiten der Anmelder abgeleitet sind, definieren die SSP-Polypeptide, die die Anmelder bei ihrer Erfindung verwenden:
Das synthetische Polypeptid umfasst n Heptadeinheiten (defgabc), wobei jedes Heptad entweder gleich oder verschieden ist, wobei:
n mindestens 4 beträgt;
a und d unabhängig aus der Gruppe ausgewählt werden bestehend aus Met, Leu, Val, Ile und Thr;
e und g unabhängig aus der Gruppe ausgewählt werden, bestehend aus den Säure/Basenpaaren Glu/Lys, Lys/Glu, Arg/Glu, Arg/Asp, Lys/Asp, Glu/Arg, Asp/Arg und Asp/Lys; und
b, c und f unabhängig irgendwelche Aminosäuren, mit Ausnahme von Gly oder Pro, sind und mindestens zwei Aminosäuren von b, c und f in jedem Heptad aus der Gruppe ausgewählt sind, bestehend aus Glu, Lys, Asp, Arg, His, Thr, Ser, Asn, Gln, Cys und Ala.

CHIMÄRE GENE, DIE LYSINREICHE POLYPEPTIDE KODIEREN

[0108] DNA-Sequenzen, die die oben beschriebenen Polypeptide kodieren, können auf der Basis der genetischen Code konstruiert werden. Wo multiple Codons für spezifische Aminosäuren existieren, sollten die Codons aus denjenigen ausgewählt werden, die für die Translation in Pflanzen vorzuziehen sind. Oligonukleotide, die diesen DNA-Sequenzen entsprechen, können unter Anwendung eines ABI-DNA-Synthetisierers synthetisiert, mit Oligonukleotiden einem Annealing unterworfen werden, die dem komplementären Strang entsprechen und in einen Plasmidvektor durch Methoden, die den mit dem Stand der Technik vertrauten Fachleuten bekannt sind, insertiert werden. Die kodierten Polypeptidsequenzen können durch Insertieren zusätzlicher Oligonukleotide, die einem Annealing unterworfen worden sind, an Restriktionsendonukleasestellen verlängert werden, die in die synthetischen Gene einengineered worden sind. Einige repräsentative Strategien für das Konstruieren von Genen, die lysinreiche erfindungsgemäße Polypeptide kodieren, sowie DNA- und Aminosäuresequenzen bevorzugter Ausführungsformen sind in Beispiel 8 bereitgestellt.

[0109] Ein chimäres Gen, das zum Exprimieren von RNA für ein synthetisches Speicherprotein-Gen konstruiert ist, das ein lysinreiches Polypeptid kodiert, kann durch Verknüpfen des Gens mit irgendeiner der oben beschriebenen pflanzlichen Promotorsequenzen konstruiert werden. Bevorzugte Promotoren wären samenspezifischen Promotoren. Für Sojabohnen-, Raps- und andere zweikeimblättrige Pflanzen würden stark samenspezifische Promotoren aus einem Bohnenphaseolingen, einem Sojabohnen-β-conglyciningen, Glyciningen, Kunitz-Trypsininhibitorgen oder Rapssamennapingen bevorzugt werden. Für Mais- und andere einkeimblättrige Pflanzen würde ein stark endospermspezifischer Promotor, z.B. der 10 kD- oder 27 kD-Zeinpromotor oder ein stark embryospezifischer Promotor, z.B. der Maisglobulin 1-Promotor, bevorzugt werden.

[0110] Um Pflanzen zu erhalten, die ein chimäres Gen für ein synthetisches Speicherproteingen exprimieren, das ein lysinreiches Polypeptid kodiert, können Pflanzen durch irgendeine der oben beschriebenen Methoden transformiert werden. Um Pflanzen zu erhalten, die sowohl ein chimäres SSP-Gen als auch ein chimäres Gen exprimieren, das gegen Lysin unempfindliche DHDPS kodiert, könnte das SSP-Gen mit dem chimären Gen verknüpft werden, das die gegen Lys unempfindliche DHDPS kodiert, und die beiden Gene könnten durch Transformation in Pflanzen eingeführt werden. Als Alternative könnte das chimäre SSP-Gen in vorher transformierte Pflanzen eingeführt werden, die die gegen Lysin unempfindliche DHDPS exprimieren, oder das SSP-Gen könnte in normale Pflanzen eingeführt werden und die erhaltenen Transformanten könnten mit Pflanzen gekreuzt werden, die gegen Lysin unempfindliche DHDPS exprimieren.

[0111] Die Ergebnisse genetischer Kreuzungen transformierter Pflanzen, die Lysinbiosynthesegene enthalten, mit transformierten Pflanzen, die lysinreiche Proteingene enthalten (man vergleiche Beispiel 10) zeigen, dass die gesamten Lysinniveaus in Samen durch koordinierte Expression dieser Gene erhöht werden können. Dieses Ergebnis war besonders auffallend, weil die Genkopiezahl aller Transgene im Hybrid reduziert war. Es ist zu erwarten, dass das Lysinniveau noch weiter erhöht würde, wenn die Biosynthesegene und die lysinreichen Proteingene alle homozygot wären.

BEISPIELE

[0112] Die vorliegende Erfindung wird des Weiteren in den folgenden Beispielen definiert, in denen alle Teile und Prozentsätze auf das Gewicht bezogen und Grade in Celsius ausgedrückt sind, es sei denn, es wird etwas anderes angegeben.

BEISPIEL 1

ISOLATION DER E. COLI- und CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM-dapA-GENE

[0113] Das E. coli-dapA-Gen (EcodapA) ist vorher kloniert, durch Restriktionsendonuklease kartiert und sequenziert worden [Richaud et al (1986) J. Bacteriol. 166:297-300]. Für die vorliegende Erfindung wurde das dapA-Gen auf einem bakteriophagen Lambda-Klon aus einer geordneten Bibliothek von 3400 überlappenden Segmenten klonierter E. coli-DNA erhalten, die durch Kohara, Akiyama und Isono [Kohara et al. (1987) Cell 50:595-508] konstruiert wurde. Aus der Kenntnis der Kartenposition von dapA bei 53 min auf der genetischen E. coli-Karte [Bachman (1983) Mikrobiol. Rev. 47:180-230], der Restriktionsendonukleasekarte des klonierten Gens [Richaud et al. (1986) J. Bacteriol. 166:297-300] und der Restriktionsendonukleosekarte der klonierten DNA-Fragmente in der E. coli-Bibliothek [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 zu wählen. Die Phagen wurden in flüssiger Kultur aus einzelnen Plaques wie beschriebe [vergleiche Current Protocols in molecular Biology (Gegenwärtige Protokolle in der molekularen Biologie) Ausubel et al. Verlag., John Wiley & Sons New York] unter Anwendung von LE392 als Wirt gezüchtet [man vergleiche Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual (Molekulares Klonieren: ein Laborhandbuch), Cold Spring Harbor Laboratory Press]. Phagen-DNA wurde durch Phenolextraktion, wie beschrieben [man vergleiche Current Protocols in Molecular Biology (gegenwärtige Protokolle in der molekularen Biologie (1987) Ausubel et al. Verlag John Wiley & Sons, New York] hergestellt. Beide Phagen enthielten ungefähr 2,8 kb Pst I-DNA-Fragment, wie für das dapA-Gen zu erwarten war [Richaud et al. (1986) J. Bacteriol. 166:297-300]. Das Fragment wurde vom Digest der Phage 5A8 isoliert und in Plasmid pBT427, das digerierten Pst-I-Vektor pBR322 ergibt, insertiert.

[0114] Das Corynebacterium dapA-Gen (cordapA) wurde genomischer DNA vom ATCC-Stamm 13032 unter Anwendung der Polymerasekettenreaktion (PKR) isoliert. Die Nukleotidsequenz des Corynebacterium dapA-Gens ist veröffentlicht worden [Bonnassie et al. (1990) Nucleic Acids Res. 18:6421]. Aus dieser Sequenz war es möglich, Oligonukleotidprimer für die PKR zu konstruieren, die die Amplifikation eines DNA-Fragments erlauben würden, das das Gen enthält, und gleichzeitig einzige Restriktionsendonukleasestellen am Startcodon (Nco I) und gerade nach dem Stopcodon (EcoR I) des Gens zufügen würde. Die verwendeten Oligonukleotidprimer waren:
SEQ ID NO: 1:
CCCGGGCCAT GGCTACAGGT TTAACAGCTA AGACCGGAGT AGAGCACT
SEQ ID NO: 2:
GATATCGAAT TCTCATTATA GAACTCCAGC TTTTTC

[0115] Die PKR wurde unter Anwendung eines Perkin-Elmer Cetus-Kits den Anleitungen der Verkäuferfirma an einem durch die gleiche Firma hergestellten Wärmezykler durchgeführt. Das Reaktionsprodukt, wenn es einem Arbeitsgang auf Agarosegel unterworfen und mit Ethidiumbromid gefärbt wird, zeigte eine starke DNA-Bande der Größe, die für das Corynebacterium dapA-Gen zu erwarten ist, nämlich ca. 900 bp. Das durch PKR gebildete Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen Nco I und EcoR I digeriert und in den Expressionsvektor pBT430 (vergleiche Beispiel 2), der mit den gleichen Enzymen digeriert worden war, insertiert. Zusätzlich zum Einführen einer Nco-Stelle am Translationsstartcodon führten die PKR-Primer auch zu einer Änderung des zweiten Codons von der AGC-Kodierung von Serin zur GCT-Kodierung für Alanin. Mehrere Klone, die aktive, gegen Lysin unempfindliche DHDPS (vergleiche Beispiel 2) exprimieren, wurden isoliert, was anzeigt, dass die zweite Codonaminosäuresubstitution die Aktivität nicht beeinflusste; ein Klon wurde mit FS766 bezeichnet.

[0116] Das Nco I bis EcoR I-Fragment, das das durch PKR gebildete Corynebacterium dapA-Gen trägt, wurde in den Phagemidvektor pGEM-9Zf(–) von Promega subkloniert, eine einstrangige DNA wurde zubereitet und sequenziert. Dieses Sequenz ist in SEQ ID NO:3 gezeigt.

[0117] Von den schon erwähnten Unterschieden im zweiten Codon abgesehen, entsprach die Sequenz der veröffentlichten Sequenz bis auf zwei Positionen, die Nukleotide 798 und 799. In der veröffentlichten Sequenz sind diese TC, während sie bei dem in SEQ ID NO:3 gezeigten Gen C7 sind. Diese Änderung führt zu einer Aminosäuresubstitution von Leucin für Serin. Der Grund für diesen Unterschied ist nicht bekannt. Er kann einem Fehlers in der veröffentlichten Sequenz, dem Unterschied in zum Isolieren des Gens verwendeten Stämmen oder einem durch PKR hervorgerufenen Fehler beruhen. Letzteres scheint unwahrscheinlich, da die gleiche Änderung in mindestens 3 unabhängig isolierten durch PKR gebildeten dapA-Genen beobachtet wurde. Der Unterschied hat keine Auswirkung auf die DHDPS-Enzymaktivität (vergleiche Beispiel 2).

BEISPIEL 2

HOCHNIVEAU-EXPRESSION DER E. COLI UND CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM dapA-GENE IN E. COLI

[0118] Eine Nco I (CCATGG)-Stelle wurde am Translationinitiationscodon des E. coli dapA-Gens unter Anwendung der durch Oligonukleotid dirigierten Mutagenese insertiert. Das 2,8 kb Pst I DNA-Fragment, das das dapA-Gen im Plasmid pBT427 trägt (vergleiche Beispiel 1) wurde in die Pst I-Stelle des Phagemidvektors pTZ18R (Pharmacia) unter Erzeugung von pBT431 insertiert. Die Orientierung des dapA-Gens war derart, dass der Kodierstrang auf der einstrangingen Phagemid-DNA vorhanden wäre. Die durch Oligonukleotid dirigierte Mutagenese wurde unter Anwendung eines Muta-Gen-Kits von Bio-Rad, dem Protokoll des Herstellers gemäß mit dem unten gezeigten mutagenen Primer durchgeführt:
SEQ ID NO:4:
CTTCCCGTGA CCATGGGCCA TC

[0119] Mutmaßliche Mutanten wurden auf das Vorliegen einer Nco I-Stelle hin gescreened und es wurde aufgezeigt, dass ein Plasmid, das pBT437 genannt wird, die richtige Sequenz in der Nähe der Mutation durch das DNA-Sequenzieren aufweist. Die Addition einer Nco I-Stelle am Translationsstartcodon führte auch zu einer Änderung des zweiten Codons von der TTC-Kodierung für Phenylalanin zur GTC-Kodierung für Valin.

[0120] Um eine Hochniveauexpression der dapA-Gene in E. coli zu erreichen, wurde der Bakterienexpressionsvektor pBT430 verwendet. Dieser Expressionsvektor ist ein Derivat von pET-3a [Rosenberg et al. (1987) (Gene 56:125-135], bei dem das bacteriophage T7 RNA-Polymerase/T7-Promotorsystem verwendet wird. Der Plasmid pBT430 wurde konstruiert, indem die Ecor I und Hind III-Stellen in pET-3a zuerst an ihren Orginalpositionen zerstört wurden. Ein Oligonukleotidadaptor, der Eeor I- und Hind-Stellen enthält, wurde an der BamH I-Stelle von pET-3a insertiert. Dieses bildete pET-3aM mit zusätzlichen einzigen Klonierstellen für die Insertion von Genen in den Expressionsvektor. Daraufhin wurde die Nde I-Stelle an der Position der Translationsinitiation zu einer Nco I-Stelle unter Anwendung von durch Oligonukleotid dirigierter Mutagenese umgewandelt. Die DNA-Sequenz von pET-3aM in dieser Region, nämlich 5'-CATATGG, wurde zu 5'-CCCATGG in pBT430 umgewandelt.

[0121] Das E. coli dapA-Gen wurde aus dem Plasmid pBT437 als 1150 bp Nco I-Hind III-Fragment ausgeschnitten und in den Expressionvektor pBT430, der mit dem gleichen Enzymen digeriert worden war, unter Erzeugung des Plasmids pBT422 insertiert. Zum Exprimieren des Corynebacterium dapA-Gens wurde das 917 bp Nco I bis EcoR I-Fragment von SEQ ID NO:3 in pBT430 insertiert (pFS766, vergleiche Beispiel 1) verwendet.

[0122] Für die Hochniveauexpression wurde jedes der Plasmide in den E. coli-Stamm BL21(DE3) transformiert [Studier et al. (1986) J. Mol. Biol. 189:113-130]. Es wurden Kulturen in Ampicillin (100 mg/l) enthaltendem LB-Medium bei 25 °C gezüchtet. Bei einer optischen Dichte bei 600 nM von ca. 1 wurde IPTG (Isopropylthio-β-Galactosid, der Induzierer) einer Endkonzentration von 0,4 nM hinzugegeben und die Inkubation 3 Stunden bei 25 °C fortgeführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren aufgefangen und erneut in 1/20tel oder (1/100tel) des Originalkulturvolumens in 50 nM NaCl; 50 mM Tris-Cl, pH-Wert 7,5; 1 mM EDTA suspendiert und bei –20 °C eingefroren. Gefrorene Aliquote von 1 ml wurden bei 37 °C aufgetaut und in einem Eiswasserbad zum Lysieren der Zellen einer Schallbehandlung unterworfen. Das Lysat wurde bei 4 °C 5 Minuten lang bei 15.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Granulat erneut in 1 ml des obigen Puffers suspendiert.

[0123] Der Überstand und die Granulatfraktionen uninduzierter und IPTG-induzierter Kulturen von BL21 (DE3)/pBT442 oder BL21(D3)/pFS766 wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert. Der Hauptteil des durch Coomassie-Blau-Färben im Überstand sichtbaren Proteins und der Granulatfraktionen beider induzierter Kulturen wiesen eine Molmasse von 32-34 kd, der für DHDPS zu erwartenden Größe, auf. Selbst in uninduzierten Kulturen war dieses Protein das auffälligste gebildete Protein.

[0124] In den IPTG-induzierten BL21(DE3)/pBT442-Kulturen befanden sich etwa 80% des DHDPS-Proteins im Überstand und die DHDPS stellte 10-20% des gesamten Proteins im Extrakt dar. In den IPTG-induzierten BL21(DE3)/pFS766-Kulturen befanden sich mehr als 50% des DHDPS-Proteins in der Granulatfraktion. Die Granulatfraktionen bestanden in beiden Fällen aus 90-95% reiner DHDPS, wobei kein anderes einzelnes Protein in signifikanten Mengen vorlag. So waren diese Fraktionen rein genug zur Verwendung bei der Bildung von Antikörpern. Die Granulatfraktionen, die 2-4 Milligramm entweder von E. coli DHDPS oder Corynebacterium DHDPS enthielten, wurden in 50 mM NaCl; 50 mM Tris-Cl, pH-Wert 7,5; 1 mM EDTA, 0,2 mM Dithiothreitol, 0,2% SDS löslich gemacht und an die Hazelton Research Facility (310 Swampridge Road, Denver, PA 17517) geschickt, um Kaninchenantikörper gegen diese Protein züchten zu lassen.

[0125] Die DHDPS-Enzymaktivität wurde wie folgt durch Assay bestimmt: Assay-Mischung (für Assayröhren von 10 × 1,0 ml oder 40 × 0,25 ml für Mikrotiterplatten) vor der Verwendung frisch hergestellt:
2,5 ml H_2O
0,5 ml 1,0 m Tris-HCl, pH-Wert 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-Aspartin-β-Semialdehyd (ASA) in 1,0 N HCl

	Assay (1,0 ml)	MikroAssay (0,25 ml)
DHDPS-Assaymischung	0,40 ml	0,10 ml
Enzymextrakt +H_2O	0,10 ml	0,025 ml
10 mM L-Lysin	5 µl oder 20 µl	1µl oder 5 µl

[0126] Bei 30 °C für die erwünschte Zeitspanne inkubieren. Durch Zusatz von:

1,0 N HCl	0,50 ml	0,125 ml

abbrechen.

[0127] Man lässt die Farbe sich 30-60 Minuten lang entwickeln. Die Ausfällung wird in einer Eppendorf-Zentrifuge geschleudert. OD_{540} gegen 0 min als Blindwert ablesen. Für den MikroAssay wird ein Aliquot 1 von 0,2 ml in eine Mikrotitervertiefung eingegeben und bei OD_{530} abgelesen.

[0128] Die spezifische Aktivität der E. coli DHDPS in der überstehenden Fraktion von induzierten Extrakten betrug ca. 50 OD_{540} Einheiten pro Minute pro Milligramm Protein in einem Assay von 1,0 ml. Die E. coli DHDPS war für die Anwesenheit von L-Lysin im Assay empfindlich. Bei einer Konzentration von ca. 0,5 mM wurde eine Inhibition von fünfzig Prozent aufgefunden. Für Corynebacterium DHDPS wurde die Aktivität in der überstehenden Fraktion uninduzierter Extrakte anstatt induzierter Extrakte gemessen. Die Enzymaktivität betrug ca. 4 OD_{530}-Einheiten pro Minute pro Milligramm Protein in einem Assay von 0,25 ml. Im Gegensatz zur E. coli DHDPS wurde Corynebacterium DHDPS durch L-Lysin selbst in einer Konzentration von 70 mM nicht inhibiert.

BEISPIEL 3

ISOLIERUNG DES E. COLI lysC-GENS UND MUTATIONEN IN lysC, DIE ZU GEGEN LYSIN UNEMPFINDLICHER AKIII FÜHREN

[0129] Das E. coli lysC-Gen ist schon vorher kloniert, 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 geordneten Bibliothek von 3400 sich überlappenden Segmenten von klonierter E. coli DNA erhalten, die durch Kohara, Akiyama und Isono [Kohara et al. (1987) Cell 50:595-508] konstruiert wurde. Diese Bibliothek bietet eine physikalische Karte des gesamten E. coli-Chromosoms und stellt die Verbindung zwischen der physikalischen Karte und der genetischen Karte her. Aufgrund der Kenntnis der Kartenposition von lysC bei 90 min auf der genetischen Karte von E. coli [Theze et al. (1974) J. Bacteriol. 117:133-143], der Restriktionsendonukleasekarte des klonierten Gens [Cassan et al.

(1986) J. Biol. Chem. 261:1052-1057] und der Restriktionsendonukleasekarte der klonierten DNA-Fragmente in der E. coli-Bibliothek [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 das Tragen des lysC Gens zu wählen. Die Phagen wurden in flüssiger Kultur aus einzelnen Plaques wie beschrieben [vergleiche Current Protocols in Molecular Biology (Gegenwärtige Protokolle in der Molekularbiologie) (1987) Ausubel et al. John Wiley & Sons, New York] unter Anwendung von LE392 als Wirt gezüchtet [vergleiche Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press]. Phagen-DNA wurde, wie beschrieben, durch Phenolextraktion zubereitet [vergleiche Current Protocols in Molecular Biology (gegenwärtige Protokolle in der Molekularbiologie) (1987) Ausubel et al., John Wiley & Sons, New York].

[0130] Aus der Sequenz des Gens wurden mehrere Restriktionsendonukleasefragemente, die für das lysC-Gen diagnostisch sind, vorausgesagt, einschließlich eines 1860 bp EcoR I-Nhe I-Fragments, eines 2140 bp EcoR I-Xmn I-Fragments und eines 1600 bp EcoR I-BamH I-Fragments. Jedes dieser Fragmente wurde in beiden Phagen-DNA erfasst, was bestätigt, dass diese das lysC-Gen trugen. Das EcoR I-Nhe I-Fragment wurde isoliert und im Plasmid pBR322, das mit den gleichen Enzymen digeriert worden war, unter Erzeugung eines gegen Ampicillin resistenten, gegen Tetracyclin empfindlichen E. coli-Transformanten subkloniert. Das Plasmid wurde mit pBT436 bezeichnet.

[0131] Um festzustellen, dass das klonierte lysC-Gen funktionsfähig war, wurde pBT436 in den E. coli- Stamm Gif106M1 (E. coli-Stamm aus dem Genetic Stock Center-Stamm CGSC-5074) transformiert, das in jedem der drei E. coli AK-Gene Mutationen aufweist [Theze et al. (1974) J. Bacteriol. 117:133-143]. Diesem Stamm fehlt jegliche AK-Aktivität und er erfordert deshalb Diaminopimelat (einen Vorläufer zu Lysin, der auch für die Zellwandbiosynthese wesentlich ist), Threonin und Methionin. Bei dem transformierten Stamm sind alle diese Ernährungserfordernisse nicht erforderlich, was zeigt, dass das klonierte lysC-Gen funktionsfähige AKIII kodiert.

[0132] Der Zusatz von Lysin (oder Diaminopimelat, das ohne Weiteres in vivo zu Lysin umgewandelt wird) in einer Konzentration von ca. 0,2 mM zum Wachstumsmedium hemmt das Wachstum von Gif106M1, das mit pBT436 transformiert worden ist. M9-Medium [vergleiche Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning; a Laboratory Manual (Molekulares Klonieren: ein Laborhandbuch), Cold Spring Harbor Laboratory Press], dem zum Ergänzen Arginin und Isoleucin, die für das Wachstum von Gifl06M1 erforderlich sind, und Ampicillin zum Aufrechterhalten der Selektion zum pBT436 Plasmid zugesetzt worden wind, wurde angewendet. Diese Inhibition wird durch Zugabe von Threonin plus Methionin zum Wachsumsmedium rückgängig gemacht. Diese Ergebnisse zeigten, dass AKIII durch exogenes Zugeben von Lysin gehemmt werden konnte, was zu einem vollständigen Mangel anderer Aminosäuren, die von Aspartat deriviert sind, führt. Diese Eigenschaft von durch pBT436 transformiertem Gif106M1 wurde benutzt, um Mutationen in lysC_auszuwählen, das gegen Lysin unempfindlichen AKIII kodiert.

[0133] Einzelne Kolonien von Gif106M1, die mit pBT436 transformiert sind, wurden ausgesucht und erneut in 200 µl einer Mischung von 100 µl 1% Lysin plus 100 µl M9-Medium suspendiert. Die gesamte Zellsuspension, die 10^7-10^8 Zellen enthält, wurde in einer Petrischale ausgebreitet, die M9-Medium enthielt, dem zusätzlich Arginin, Isoleucin und Ampicillin zugegeben worden war. Sechzehn Petrischalen wurden auf diese Weise zubereitet. 1 bis 20 Kolonien erschienen auf 11 von 16 Petrischalen. Eine oder zwei (falls vorhanden) Kolonien wurden ausgesucht und auf Lysinresistenz hin geprüft und daraus wurden neun gegen Lysin widerstandsfähige Klone erhalten. Plasmid-DNA wurde aus acht derselben zubereitet und wieder in Gif106M1 transformiert, um zu bestimmen, ob der Lysinwiderstandsdeterminant von Plasmid getragen wurde. Sechs der acht Plasmid-DNA ergaben gegen Lysin widerstandsfähige Kolonien. Drei dieser sechs trugen lysC-Gene, die AKIII kodieren, die durch 15 mM Lysin nicht inhibiert wurde, während AKIII vom Wildtyp durch 0,3-0,4 mM Lysin um 50% gehemmt und durch 1 mM Lysin > 90% gehemmt wird (man vergleiche Beispiel 2 bezüglich der Einzelheiten).

[0134] Um die molekulare Basis für die Widerstandsfähigkeit gegen Lysin zu bestimmen, wurden die Sequenzen des lysC-Gens vom Wildtyp und von drei mutanten Genen bestimmt. Eine Methode für das „Anwenden von Miniprepplasmid-DNA für das Sequenzieren doppelstrangiger Matrizen mit Sequenase™ [Kraft et al. (1988) Biotechniques 6:544-545] wurde angewendet. Oligonukleotidprimer, die auf der veröffentlichten lysC-Sequenz basieren und ungefähr alle 200 bp voneinander entfernt sind, wurden synthetisiert, um das Sequenzieren zu erleichtern. Die Sequenz des lysC-Gens vom Wildtyp, die in pBT436 kloniert ist (SEQ ID NO:5), war von der veröffentlichten lysC-Sequenz in der Kodierregion an den Positionen 5 verschieden. Vier dieser Nukleotidunterschiede befanden sich an der dritten Position in einem Codon und würden nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz des AKIII-Proteins führen. Einer der Unterschiede würde zu einer Cystein- zu Glycinsubstitution bei der Aminosäure 58 von AKIII führen. Diese Unterschiede sind wahrscheinlich den ver-

schiedenen Stämmen zuzuschreiben, von denen die lysC-Gene kloniert wurden.

[0135] Die Sequenzen der drei mutanten lysC-Gene, die gegen Lysin unempfindliche AK kodierten, unterschieden sich jeweils von der Sequenz vom Wildtyp durch ein einziges Nukleotid, was zu einer einzigen Aminosäuresubstitution im Protein führte. Beim mutaten M2 war ein G durch ein A am Nukleotid 954 von SEQ ID NO: 5 substituiert, was zu einer Substitution von Isoleucin für Methionin an der Aminosäure 318 führte und die mutanten M3 und M4 wiesen identische T für C-Substitutionen am Nukleotid 1055 von SEQ ID NO: 5 auf, was zu einer Substitution von Isoleucin für Threonin an der Aminosäure 352 führte. So reicht eine dieser einfachen Aminosäuresubstitutionen aus, um das AKIII-Enzym gegen Lysininhibition unempfindlich zu machen.

[0136] Eine Nco I-(CCATGG)-Stelle wurde am Translationsinitiationscodon des lysC-Gens unter Anwendung folgender Oligonukleotide insertiert:
SEQ ID NO: 6
GATCCATGGC TGAAATTGTT GTCTCCAAAT TTGGCG
SEQ ID NO: 7
GTACCGCCAA ATTTGGAGAC AACAATTTCA GCCATG

[0137] Beim Annealing weisen dies Oligonukleotide BamH I und Asp 718 „klebrige" Enden auf. Das Plasmid pBT436 wurde mit BamH I, das stromaufwärts von der lysC-Kodiersequenz, und Asp 718, das 31 Nukleotide stromabwärts vom Initiationscodon überschneidet, digeriert. Die Oligonukleotide, die ein Annealing durchgemacht haben, wurden an den Plasmidvektor ligiert und es wurden E. coli-Transformanten erhalten. Plasmid-DNA wurde zubereitet und auf die Insertion der Oligonukleotide hin aufgrund des Vorliegens einer Nco I-Stelle einem Screenen unterzogen. Ein die Stelle enthaltendes Plasmid wurde sequenziert, um sicherzustellen, dass die Insertion richtig war, und wurde mit pBT457 bezeichnet. Zusätzlich zum Bilden einer Nco 1-Stelle am Initiationscodon von lysC, änderte diese Oligonukleotidinsertion den zweiten Codon von TCT, der Serin kodiert, zu GCT, das Alanin kodiert. Diese Aminosäuresubstitution hat keine offensichtliche Wirkung auf die AKI-II-Enzymaktivitität.

[0138] Das lysC-Gen wurde aus dem Plamid pBT457 als 1560 bp Nco I-EcoH I-Fragment ausgeschnitten und in den Expressionsvektor pBT430 insertiert, der mit den gleichen Enzymen unter Erzeugung des Plamids pBT461 digeriert wird. Für das Exprimieren des mutanten lysC-M4-Gens wurde pBT461 mit Kpn I-EcoR I digeriert, wodurch das lysC-Gen vom Wiltyp von ca. 30 Nukleotiden stromabwärts vom Translationsstartcodon entfernt wird, und durch Insertieren der analogen Kpn I-EcoR I-Fragmente aus den mutanten Genen unter Erzeugung des Plasmids pBT492.

BEISPIEL 4

KONSTRUKTION VON CHIMÄREN dapA-GENEN ZUM EXPRIMIEREN IN DEN SAMEN VON PFLANZEN

[0139] Die samenspezifische Expressionskassette (**Fig. 4**) besteht aus dem Promotor und dem Transkriptionsterminator aus dem Gen, das die β-Untereinheit des Samenspeicherproteins Phaseolin aus der Bohne Phaseolus vulgaris kodiert [Doyle et al. (1986) J. Biol. Chem. 261:9228-9238]. Die Phaseolinkassette enthält ca. 500 Nukleotide stromaufwärts (5') vom Translationsinitiationscodon und ca. 1650 Nukleotide stromabwärts (3') vom Translationsstopcodon von Phaseolin. Zwischen den 5'- und 3'-Regionen befinden sich die einzigen Restriktionsendonukleasestellen Nco I (die den ATG- Translationsinitiationscodon umfassen, Sma I, Kpn I und Xba I. Die gesamte Kassette ist von Hind III-Stellen flankiert.

[0140] Pflanzliche biosynthetische Aminosäureenzyme sind dafür bekannt, dass sie in den Chloroplasten lokalisiert sind und aus diesem Grund werden sie mit einem Chloroplasttargetingsignal synthetisiert. Bakterienproteine, wie beispielsweise DHDPS und AKIII, besitzen kein derartiges Signal. Eine Chloroplasttransitsequenz (cts) wurde deshalb an die dapA- und lysC-M4-Kodiersequenz in den chimären Genen fusioniert. Die verwendete cts basierte auf der cts der kleinen Untereinheit von Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase aus Sojabohnen [Berry-Lowe et al. (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:483-498]. Die Oligonukleotide SEQ ID NOS:8-11 wurden synthetisiert und wie unten beschrieben verwendet.

[0141] Es wurden drei chimäre Gene geschaffen:
Nr. 1) Phaseolin 5'-Region/cts/lysC-M4/Phaseolin 3'-Region
Nr. 2) Phaseolin 5'-Region/cts/ecodapA/Phaseolin 3'-Region
Nr. 3) Phaseolin 5'-Region/cts/cordapA/Phaseolin 3'-Region

[0142] Die Oligonukleotide SEQ ID NO:8 und SEQ ID NO:9, die einen endständigen Carboxylteil des Chloroplasttargetingsignals kodieren, wurden einem Annealing unterzogen, was zu mit Nco I kompatiblen Enden führt, durch Polyacrylgelelektrophorese gereinigt und in mit Nco I digeriertes pBT461 insertiert. Die Insertion der richtigen Sequenz in der richtigen Orientierung wurde durch DNA-Sequenzieren nachgeprüft, was zu pBT496 führte. Die Oligonukleotide SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:11, die den Aminoendteil des Chloroplasttargetingsignals kodieren, wurden einem Annealing unterzogen, was zu mit Nco I verträglichen Enden führt, durch Polyacrylamidgelelektrophorese gereinigt und in durch Nco I digeriertes pBT496 insertiert. Die Insertion der richtigen Sequenz in der richtigen Orientierung wurde durch DNA-Sequenzieren nachgeprüft, was pBT521 ergab. So wurden die cts an das lysC-Gen fusioniert.

[0143] Zum Fusionieren der cts an das lysC-M4-Gen wurde pBT521 mit Sal I digeriert, und ein DNA-Fragment von ca. 900 bp das die cts und die Aminoendkodierregion von lysC enthielt, wurde isoliert. Dieses Fragment wurde in Sal I, das mit pBT492 digeriert ist, insertiert, wodurch die endständige Aminokodierregion von lysC-M4 effektiv durch die fusionierte cts und die endständige Aminokodierregion von lysC ersetzt wurde. Da die Mutation, die zur Lysinunempfindlichkeit führte, sich nicht in dem ersetzten Fragment befand, trug das neue Plasmid, pBT523, die an lysC-M4 fusionierten cts.

[0144] Das Nco I-Hpa I-Fragment von 1600 bp, das die an lysC-M4 fusionierte cts plus ca. 90 bp der 3'- nichtkodierenden Sequenz enthielt, wurde isoliert und in die samenspezifische Expressionskassette insertiert, die mit Nco I und Sma I (chimäres Gen Nr. 1) digeriert war, unter Bildung des Plasmids pBT544 insertiert.

[0145] Vor der Insertion in die Expressionskassette wurde das ecodapA-Gen modifiziert, um eine Restriktionsendonukleasestelle, Kpn I, gerade nach dem Translationsstopcodon zu insertieren. Die Oligonukleotide SEQ ID NO:12-13 wurden zu diesem Zweck synthetisiert:
SEQ ID NO:12:
CCGGTTTGCT GTAATAGGTA CCA
SEQ ID NO:13:
AGCTTGGTAC CTATTACAGC AAACCGGCAT G

[0146] Die Oligonukleotide SEQ ID NO:12 und SEQ ID NO:13 wurden einem Annealing unterworfen, was zu einem mit Sph I kompatiblen Ende an einem Ende und einem mit Hind III kompatiblen Ende am anderen führte, und in Sph I plus Hind III insertiert, das mit pBT437 digeriert worden war. Die Insertion der richtigen Sequenz wurde durch DNA-Sequenzierung unter Bildung von pBT443 nachgeprüft.

[0147] Ein Nco I-Kpn I-Fragment von 880 bp aus pBT443, das die gesamte ecodapA-Kodierregion enthielt, wurde aus einem Agarosegel auf die Elektrophorese hin isoliert und in die samenspezifische Expressionskassette, die mit Nco I und Kpn I digeriert wurde, unter Bildung des Plasmids pBT494 insertiert. Die Oligonukleotide SEQ ID NO:8-11 wurden wie oben beschrieben verwendet, um eine cts der ecodapA-Kodierregion in der samenspezifischen Expressionskassette hinzuzufügen, unter Bildung des chimären Gens Nr. 2 in pBT520.

[0148] Ein Nco I-EcoR I-Fragment von 870 bp aus pFS766, das die gesamte cordapA-Kodierregion enthielt, wurde aus einem Agarosegel auf die Elektrophorese hin isoliert und in die Blattexpressionskassette insertiert, die mit Nco I und EcoR I digeriert worden war, unter Bildung des Plasmids pFS789. Um das cts an das cordapA-Gen anzuknüpfen, wurde ein DNA-Fragment, das die gesamte cts enthielt, unter Anwendung der PKR zubereitet. Die Matrizen-DNA war pBT544 und die verwendeten Oligonukleotidprimer waren:
SEQ ID NR:14:
GCTTCCTCAA TGATCTCCTC CCCAGCT
SEQ ID NO:15:
CATTGTACTC TTCCACCGTT GCTAGCAA

[0149] Die PKR wurde unter Anwendung eines Perkin-Elmer Cetus-Kits den Anweisungen der Verkäuferfirma entsprechend auf einem Thermozykler, der von der gleichen Firma hergestellt worden war, durchgeführt. Das durch PKR gebildete 160 bp-Fragment wurde mit T4 DNA-Polymerase in Gegenwart der4 Desoxyribonukleotidtriphosphate unter Erzielung eines stumpfkantigen Fragments behandelt. Das cts-Fragment wurde in das Nco I insertiert, das den Startcodon des cordapA-Gens enthielt, das digeriert und mit dem Klenow-Fragment von DNA-Polymerase behandelt worden war, um die 5'-Überhänge zu füllen. Das insertierte Fragment und die Vektor/Insertionsverbindungen wurden durch DNA-Sequenzieren als richtig bestimmt.

[0150] Ein Nco I-Kpn I-Fragment von 1030 bp, das das an die cordapA-Kodierregion angeknüpfte cts enthielt, wurde aus einem Agarosegel auf die Elektrophorese hin isoliert und in die Phaseolinsamenexpressionskasset-

te insertiert, die mit Nco I und Kpn I digeriert worden war, unter Erzielung des Plasmids pFS889, die das chimäre Gen Nr. 3 enthielt.

BEISPIEL 5

TRANSFORMATION VON RAPSSAMEN MIT DEN CHIMÄREN PHASEOLINPROMOTOR/CTS/CORDAPA- UND PHASEOLINPROMOTOR/CTS/LYSC-M4-GENEN

[0151] Die chimären Genkassette Phaseolin 5'-Region/cts/cordapA/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/lysC-M4/Phaseolin 3' (Beispiel 4) wurden in den binären Vektor pZS199 insertiert (**Fig. 5A**). In pZS199 treibt der 35S-Promotor aus Blumenkohlmosaikvirus die Expression des NPT II.

[0152] Die chimäre Genkassette der Phaseolin 5'-Region/cts/cordapA/Phaseolin 3'-Region wurde unter Anwendung von Oligonukleotidadaptoren zum Umwandeln der Hind III-Stellen an jedem Ende in BamH I-Stellen modifiziert. Die Genkassette wurde dann als BamH I-Fragment von 2,7 kb isoliert und in mit BamH I digeriertem pZS199 unter Bildung des Plasmids pFS926 (**Fig. 5B**) insertiert. Bei diesem binären Vektor ist das chimäre Gen Phaseolin 5'-Region/cts/cordapA/Phaseolin 3'-Region in der gleichen Orientierung wie das Markergen 35S/NPT II/nos 3' insertiert.

[0153] Um die Phaseolin 5'-Region/cts/lysC-M4/Phaseolin 3'-Region zu insertieren, wurde die Genkassette als 3,3 kb EcoR I bis Spe I-Fragment isoliert und in EcoR I plus Xba I, das mit pZS199 digeriert worden war, unter Bildung des Plasmids pBT593 insertiert. Bei diesem binären Vektor ist das chimäre Gen Phaseolin 5'-Region/cts/lysC-M4/Phaseolin 3'-Region in der gleichen Orientierung wie das Markergen 35S/NPT II/nos 3' insertiert.

[0154] Um die beiden Kassette zu kombinieren, wurde die EcoR I-Stelle von pBT593 in eine BamH I-Stelle unter Anwendung von Oligonukleotidadaptoren konvertiert, der dabei entstehende Vektor wurde mit BamH I geschnitten, und die Genkassette 5'-Region/cts/cordapA/Phaseolin 3'-Region wurde als BamH I-Fragment von 2,7 kb isoliert und unter Bildung von pBT597 insertiert. Bei diesem binären Vektor sind beide chimären Gene Phaseolin 5'-Region/cts/cordapA/Phaseolin 3'-Region und Phaseolin 5'-Region/cts/lysC-M4/Phasoelin 3'-Region in der gleichen Orientierung wie das Markergen 35S/NPT II/nos 3' insertiert.

[0155] Der Brassica napus-Kultivar „Westar" wurde durch gleichzeitiges kultivieren von Stücken von Keimlingen mit disarmiertem Agrobacterium tumefaciens-Stamm LBA4404, der den geeigneten binären Vektor trägt, transformiert.

[0156] Samen von B. napus wurden durch Rühren in 10% Chlorox, 0,1% SDS für dreißig min. sterilisiert und dann gründlich mit sterilem destilliertem Wasser gespült. Die Samen wurden auf einem sterilen Medium, das 30 mM CaC12 und 1,5% Agar enthielt, gekeimt und sechs Tage lang im Dunkeln bei 24 °C gezüchtet.

[0157] Flüssige Kulturen von Agrobacterium für die Pflanzentransformation wurden über Nacht bei 28 °C in Minimal A-Medium gezüchtet, das 100 mg/l Kanamycin enthielt. Die Bakterienzellen wurden durch Zentrifugieren pelletiert und erneut in einer Konzentration von 10^8 Zellen/ml in flüssigem Murashige- und organischem Skoo-Minimalmedium suspendiert das 100 µm Acetosyringon enthielt.

[0158] Keimlinghypokotyle von B. napus wurden in Segmente von 5 mm geschnitten, die sofort in die Bakteriensuspension eingegeben wurden. Nach 30 min wurden die Hypokotylstücke aus der Bakteriensuspension entfernt und auf BC-35-Callusmedium aufgegeben, das 100 µm Acetosyringon enthielt. Das Pflanzengewebe und Agrobakterien wurden gleichzeitig drei Tage lang bei 24 °C in abgeblendetem Licht kultiviert.

[0159] Die gleichzeitige Kultivierung wurde durch Übertragen der Hypokotylstücke auf BC-35-Callusmedium, das 200 mg/l Carbenicillin, um die Agrobakterien abzutöten, und 25 mg/l Kanamycin, um transformiertes Pflanzenzellwachstum zu wählen, enthielt, beendet. Die Keimlingstücke wurden auf diesem Medium drei Wochen lang bei 24 °C unter kontinuierlichem Licht inkubiert.

[0160] Nach drei Wochen wurden die Segmente auf BS-48-Regenerierungsmedium übertragen, das 200 mg/l Carbenicillin und 25 mg/l Kanamycin enthielt. Das Pflanzengewebe wurde all zwei Wochen auf frisches selektives Regenerationsmedium unter den gleichen Kultivierungsbedingungen, wie für das Callusmedium beschrieben, subkultiviert. Mutmaßlich transformierte Calli wuchsen schnell auf Regenerierungsmedium; als die

Calli einen Durchmesser von ca. 2 mm erreichten, wurden sie von den Hypocotylstücken entfernt und auf das gleiche Medium, das kein Kanamycin aufwies, aufgegeben.

[0161] Es begannen innerhalb mehrere Wochen nach der Übertragung auf das BS-48-Regenerierungsmedium Schößlinge zu erscheinen. Sobald die Schößlinge wahrnehmbare Stiele gebildet hatten, wurden sie von den Calli abgeschnitten, auf MSV-1A Verlängerungsmedium übertragen und zu einer Photoperiode von 16:8-h bei 24 °C überführt.

[0162] Sobald Schößlinge mehrere Stengelglieder gewachsen waren, wurden sie über der Agaroberfläche abgeschnitten und die Schnittenden wurden in Rootone getaucht. Die behandelten Schößlinge wurden direkt in bodenfreies Topferdemedium Metro-Mix 350 eingepflanzt. Die Töpfe wurden mit Kunststoffbeuteln bedeckt, die entfernt wurden, als die Pflanzen klar ersichtlich wuchsen, und zwar nach ca. zehn Tagen. Die Ergebnisse der Transformation sind in Tabelle 1 gezeigt. Transformierte Pflanzen wurden mit jedem der binären Vektoren erhalten.

Bakterienwachstumsmedium Miminal A

[0163] Man löst Folgendes in destilliertem Wasser:

10,5 g	zweibasisches Kaliumphosphat
4,5 g	einbasisches Kaliumphosphat
1,0 g	Ammoniumsulfat
0,5 g	Natriumcitratdihydrat

[0164] Man füllt mit destilliertem Wasser auf 979 ml auf.

Autoklavieren

[0165] Man setzt 20 ml filtersterilisierte 10%-ige Saccharose hinzu.

[0166] Man setzt 1 ml filtersterilisiertes 1 M $MgSO_4$ hinzu.

Brassica Callus-Medium BC-35

Pro Liter:

Organisches Murashige- und Skoog-Minimalmedium
(MS-Salze, 100 mg/l i-Inositol, 0,4 mg/l Thiamin; GIBCO #510-3118)
30 g Saccharose
15 g Mannit
0,5 mg/l 2,4-D
0,3 mg/l Kinetin
0,6% Agarose
pH-Wert 5,8

Brassica-Regenerierungsmedium BS-48

Organisches Murashige- und Skoog-Minimalmedium
Gamborg B5 Vitamine (SIGMA #1019)
10 g Glukose
250 mg Xylose
600 mg MES
0,4% Agarose
pH-Wert 5,7

[0167] Man filtersterilisiert und setzt nach dem Autoklavieren folgendes hinzu:
2,0 mg/l Zeatin
0,1 mg/l IAA

Verlängerungsmedium MSV-1A für Brassica-Schößlinge

Organisches Murashige- und Skoog-Minimalmedium
Gamborg B5 Vitamine
10 g Saccharose
0,6% Agarose
pH-Wert 5,8

TABELLE 1: RAPS-TRANSFORMANTEN

Binärer Vektor	Anzahl von Schnittenden	Anzahl von KAN^R-Calli	Anzahl von CALS Schößling-Calli	Anzahl von Pflanzen
pZS199	120	41	5	2
pFS926	600	278	52	28
pBT593	600	70	10	3
pBT597	600	223	40	23

[0168] Die Pflanzen wurden unter einer Photoperiode von 16:8-h bei einer Tagestemperatur von 23 °C und einer Nachtemperatur von 17 °C gezüchtet. Als der primäre Blütenstengel sich zu verlängern begann, wurde er mit einem aus Maschengewebe bestehenden Beutel zum Zusammenhalten von Pollen zum Verhindern des Auskreuzens bedeckt. Die Selbstbestäubung wurde durch mehrmaliges Schütteln der Pflanzen am Tag erleichtert. Reife Samen, die aus der Selbstbestäubung erhalten wurden, wurden ca. drei Monate nach dem Auspflanzen geerntet.

[0169] Ein teilweise entfettetes Samenmehl wurde wie folgt zubereitet: 40 Milligramm reife trockene Samen wurden mit einer Reibeschale und Stößel unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerrieben. 1 Milliliter Hexan wurde zugegeben und die Mischung wurde 15 min lang bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Mehl wurde in einer Eppendorfzentrifuge pelletiert, das Hexan entfernt und die Hexanextraktion wiederholt. Das Mehl wurde daraufhin 10 min lang bei 65 °C getrocknet, bis das Hexan unter Zurücklassen eines trockenen Pulvers vollständig verdampft war. Die gesamten Proteine wurden wie folgt aus reifen Samen extrahiert. Ca. 30-40 mg Samen wurden in eine wegwerfbare Mikrofugenröhre von 1,5 ml eingegeben und in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, pH-Wert 6,8, 2 mM EDTA, 1% SDS, 1% β-Mercaptoethanol gemahlen. Das Mahlen erfolgte unter Anwendung einer motorisierten Mahlvorrichtung mit wegwerfbaren Kunststoffwellen, die so konstruiert waren, dass sie in die Mikrofugenröhre passten. Die dabei gebildeten Suspensionen wurden 5 min lang bei Raumtemperatur in einer Mikrofuge zum Entfernen von teilchenförmigen Substanzen zentrifugiert. Drei Volumen Extrakt wurden mit 1 Volumen Probepuffer von 4 × SDS-Gel (0,17 m Tris-HCl, pH-Wert 6,8, 6,7% SDS, 16,7% β-Mercaptoethanol, 33% Glycerin) gemischt und von jedem Extrakt wurden 5 µl pro Bahn auf einem SDS-Polyacrylamidgel einem Arbeitsgang unterworfen, wobei bakteriell hergestellte DHDPS oder AKIII als Größenstandard diente, und Protein, das aus untransformierten Tabaksamen extrahiert worden waren, als negative Kontrolle diente. Die Proteine wurden dann elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Die Membranen wurden den DHDPS- oder AKIII-Antikörpern in einer Verdünnung von 1:5000 des Kaninchenserums unter Anwendung eines Standardprotokolls, das von BioRad mit ihrem Immun-Blotkit bereitgestellt wurde, ausgesetzt. Auf das Spülen zum Entfernen von ungebundendem primärem Antikörper hin, wurden die Membranen dem sekundären Antikörper, nämlich Esel-Anti-Kaninchen-Ig, das an Meenettichperoxidase (Amersham) konjugiert worden war, in einer Verdünnung von 1:3000 ausgesetzt. Auf das Spülen zum Entfernen von ungebundenem sekundärem Antikörper hin, wurden die Membranen einem Chemilumineszenzreagenz von Amersham und Röntgenfilm ausgesetzt.

[0170] Acht von acht FS926-Transformanten und sieben von sieben BT597-Transformanten exprimierten das DHDPS-Protein. Der einzige BP593-Transformant und fünf von sieben BT597-Transformanten exprimierten das AKIII-M4-Protein (Tabelle 2).

[0171] Um die freie Aminosäurezusammensetzung der Samen zu messen, wurden freie Aminosäuren aus 40 Milligramm des entfetteten Mehls in 0,6 ml Methanol/Chloroform/Wasser, das im Verhältnis von 12 Vol./5 Vol./Vol. (MCW) bei Raumtemperatur gemischt worden war, extrahiert. Die Mischung wurde in der Wirbelvorrichtung behandelt und dann in einer Eppendorf-Mikrozentrifuge ca. 3 min lang zentrifugiert. Ca 0,6 ml der überstehenden Flüssigkeit wurden dekantiert und zusätzliche 0,2 ml MCW dem Granulat hinzugegeben, das

dann in der Wirbelvorrichtung behandelt und wie oben zentrifugiert wurde. Die zweite überstehende Flüssigkeit, ca. 0,2 ml, wurde der ersten hinzugegeben. Diesem wurden 0,2 ml Chloroform gefolgt von 0,3 ml Wasser hinzugegeben. Die Mischung wurde in der Wirbelvorrichtung behandelt und dann in einer Eppendorf-Mikrozentrifuge ca. 3 min lang zentrifugiert, die obere wässrige Phase, ca. 1,0 ml wurde entfernt und in einem Savant Speed Vac-Konzentrator getrocknet. Die Proben wurden in 6N Salzsäure, 0,4% β-Mercaptoethanol unter Stickstoff 24 h bei 110-120 °C hydrolysiert; 1/4 der Probe wurde auf einem Beckman Aminosäureanalysator, Modell 6300, unter Anwendung der Nachsäulen-Ninhydrinerfassung einem Arbeitsgang unterzogen. Die relativen Niveaus freier Aminosäure in den Samen wurden als Verhältnisse von Lysin oder Threonin zu Leucin verglichen, wobei Leucin so als interner Standard verwendet wurde.

[0172] Es bestand eine gute Korrelation zwischen Transformanten, die höhere Niveaus an DI-IDPS-Protein exprimierten und denjenigen, die höhere Niveaus an freiem Lysin aufweisen. Die höchsten Expressionslinien zeigten eine mehr als 100 fache Erhöhung des freien Lysinniveaus in den Samen auf. Es erfolgte keine stärkere Ansammlung von freiem Lysin aufgrund der Expression von AKIII-M4 zusammen mit Corynebacteria DHDPS im Vergleich mit der Expression von Corynebacteria DHDPS als solcher. Der Transformant, der AKIII-M4 in Abwesenheit der Corynebacteria DHDPS exprimiert, zeigte eine 5-fache Erhöhung des Niveaus von freiem Threonin in den Samen. Ein höheres Niveau an α-Aminoadipinsäure, das auf einen Lysinkatabolismus hindeutet, wurde bei vielen der transformierten Linien beobachtet. So sollte die Verhinderung von Lysinkatabolismus durch Inaktivierung von Lysinketoglutaratreduktase die Erhöhung der Ansammlung von freiem Lysin in den Samen noch weiter erhöhen. Als Alternative würde das Einarbeiten von Lysin in ein Peptid oder lysinreiches Protein den Katabolismus verhindern und zu einer Erhöhung der Ansammlung von Lysin in den Samen führen.

[0173] Um die gesamte Aminosäurezusammensetzung reifer Samen zu messen, wurden 2 Milligramm des entfetteten Mehls in 6N Salzsäure, 0,4% β-Mercaptoethanol unter Stickstoff 24 h bei 110-120 °C hydrolysiert; 1/100 der Probe wurde auf einem Beckman Aminosäureanalysator, Modell 6300, unter Anwendung der Nachsäulen-Ninhydrinerfassung einem Arbeitsgang unterzogen. Die relativen Niveaus von Aminosäure in den Samen wurden als Prozentsätze von Lysin, Threonin oder α-Aminoadipinsäure mit den gesamten Aminosäuren verglichen. Es bestand eine gute Korrelation zwischen Transformanten, die das DHDPS-Protein exprimieren, und denjenigen, die hohe Niveaus an Lysin aufweisen. Samen mit einer Erhöhung des Lysinniveaus von 5-100% im Vergleiche mit den untransformierten Kontrollen, wurden beobachtet. In den Samen mit den höchsten Niveaus bildet Lysin 11-13% der gesamten Samenaminosäuren, was beträchtlich höher ist als bei irgendeinem vorher bekannten Rapssamen.

TABELLE 2

FS926 Transformanten: Phaseolin 5'-Region/cts/cordapA/Phaseolin 3'

BT593 Transformanten: Phaseolin 5'-Region/cts/lysC-M4/Phaseolin 3'

BT597 Transformanten: Phaseolin 5'-Region/cts/lysC-M4/Phaseolin 3'

Phaseolin 5'-Region/cts/cordapA/Phaseolin 3'

Linie	Freie Aminosäuren			DHDPS *CORYNE* WESTERN ANALYSE	AKIII-M4 *E.COLI* WESTERN ANALYSE	% GESAMTE AMINOSÄUREN		
	K/L	T/L	AA/L			K	T	AA
WESTAR	0,8	2,0	0	-	-	6,5	5,6	0
ZS199	1,3	3,2	0	-	-	6,3	5,4	0
FS926-3	140	2,0	16	++++	-	12	5,1	1,0
FS926-9	110	1,7	12	++++	-	11	5,0	0,8
FS926-11	7,9	2,0	5,2	++	-	7,7	5,2	0
FS926-6	14	1,8	4,6	+++	-	8,2	5,9	0
FS926-22	3,1	1,3	0,3	+	-	6,9	5,7	0
FS926-27	4,2	1,9	1,1	++	-	7,1	5,6	0
FS926-29	38	1,8	4,7	++++	-	12	5,2	1,6
FS926-68	4,2	1,8	0,9	++	-	8,3	5,5	0
BT593-42	1,4	11	0	-	++	6,3	6,0	0
BT597-14	6,0	2,6	4,3	++	+/-	7,0	5,3	0
BT597-145	1,3	2,9	0	+	-			
BT597-4	38	3,7	4,5	++++	++++	13	5,6	1,6
BT597-68	4,7	2,7	1,5	++	+	6,9	5,8	0
BT597-100	9,1	1,9	1,7	+++	++	6,6	5,7	0
BT597-148	7,6	2,3	0,9	+++	+	7,3	5,7	0
BT597-169	5,6	2,6	1,7	+++	+++	6,6	5,7	0

AA ist α-Aminoadipinsäure

BEISPIEL 6

TRANSFORMATION VON SOJABOHNEN MIT DEN CHIMÄREN GENEN PHASEOLINPROMOTOR/CTS/CORDAPA UND PHASEOLINPROMOTOR/CTS/LYSC-M$

[0174] Die chimären Genkassetten Phaseolin 5'-Region/cts/cordapA/Phaseolin 3'-Region plus Phaseolin 5'-Region/cts/lysC-M4/Phaseolin 3', (Beispiel 4) wurden in den Sojabohnentransformationsvektor pBT603 insertiert (Fig. 6A). Dieser Vektor weist ein Sojabohnentransformations-Markergen auf, das aus dem 35S-Promotor aus Blumenkohlmosaikvirus besteht, das die Expression des E. coli-β-Glucornidase-(GUS)-Gens treibt [Jefferson et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8447-8451], wobei die Region Nr. 3' sich in einem modifizierten pGEM9Z-Plasmid befindet.

[0175] Zum Insertieren der Phaseolin 5'-Region/cts/lysC-M4/Phaseolin 3'-Region wurde die Genkassette als Hind III-Fragment von 3,3 kb isoliert und in Hind III insertiert, das mit pBT603 digeriert worden war, unter Bil-

dung des Plasmids pBT609. Bei diesem Vektor ist das chimäre Gen Phaseolin 5'-Region/cts/lysC-M4/Phaseolin 3'-Region in der entgegengesetzten Orientierung vom 35S/GUS/Nr. 3'-Markergen insertiert.

[0176] Die chimäre Genkassette Phaseolin 5'-Region/cts/cordapA/Phaseolin 3'-Region wurde unter Anwendung von Oligonukleotidadaptoren zum Umwandeln der Hind III-Stellen an jedem Ende zu BamH T-Stellen modifiziert. Die Genkassette wurde dann als BamH I-Fragment von 2,7 kb isoliert und in BamH I insertiert, das mit pBT609 digeriert worden war, unter Bildung des Plasmids pBT614 (**Fig. 6B**). Bei diesem Vektor sind beide chimären Gene, Phaseolin 5'-Region/cts/cordapA/Phaseolin 3'-Region plus Phaseolin 5'-Region/cts/lysC-M4/Phaseolin 3' in der gleichen Orientierung insertiert und beide befinden sich in entgegengesetzter Orientierung zum 35S/GUS/Nr. 3'-Markergen.

[0177] Das Plasmid pBT614 wurde in Sojabohnen durch Transformation durch Agractus Company (Middleton, WI) dem im Patent der Vereinigten Staaten Nr. 5015580 beschriebenen Verfahren gemäß eingeführt. Samen von fünf transformierten Linien wurden erhalten und analysiert.

[0178] Es war zu erwarten, dass die Transgene in den RI-Samen der transformierten Pflanzen getrennt vorliegen würden. Um Samen, die die Transformationsmarkergene trugen, zu identifizieren, wurde ein kleines Stückchen des Samens mit einer Rasierklinge abgeschnitten und in eine Vertiefung einer wegwerfbaren Mikrotiterplatte aus Kunststoff hineingegeben. Eine GUS-Assaymischung, die aus 100 mM NaH_2PO_4, 10 mM EDTA, 0,5 mM $K_4Fe(CN)_6$, 0,1% Triton X-100, 0,5 mg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-glucuonsäure bestand, wurde zubereitet und 0,15 ml wurden in jede Mikrotitervertiefung eingegeben. Die Mikrotiterplatte wurde 45 min lang bei 37 °C inkubiert. Die Entwicklung von blauer Farbe zeigte die Expression von GUS in dem Samen an.

[0179] Vier von fünf transformierte Linien zeigten eine Segregation von ca. 3:1 für die GUS-Expression (Tabelle 3). Dies zeigt, dass das GUS-Gen an einer einzigen Stelle im Sojabohnengenom insertiert war. Der andere Transformant zeigte eine Segregation von 9:1, was darauf hinweist, dass das GUS-Gen an zwei Stellen insertiert worden war.

[0180] Ein Mehl wurde aus einem Fragment einzelner Samen durch Mahlen zu einem feinen Pulver zubereitet. Die gesamten Proteine wurden aus dem Mehl durch Zusetzen von 1 mg zu 0,1 ml 43 mM Tris-HCl, pH-Wert 6,8, 1,7% SDS, 4,2% β-Mercaptoethanol, 8% Glycerin, Behandeln der Suspension in der Wirbelvorrichtung, Kochen für 2-3 Minuten und nochmaligem Behandeln in der Wirbelvorrichtung extrahiert. Die dabei gebildeten Suspensionen wurden 5 min lang bei Raumtemperatur in einer Mikrofuge zentrifugiert, um teilchenförmige Substanzen zu entfernen, und von jedem Extrakt wurden 10 µl pro Bahn auf einem SDS-Polyacrylamidgel einem Arbeitsgang unterworfen, wobei bakteriell hergestellte DHDPS oder AKIII als Größenstandard diente. Die Proteine wurden dann elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Die Membranen wurden den DHDPS- oder AKIII-Antikörpern in einer Verdünnung von 1:5000 bzw. 1:1000 des Kaninchenserums unter Anwendung des Standardprotokolls, das von BioRad mit ihrem Immun-Blotkit bereitgestellt wurde, ausgesetzt. Auf das Spülen zum Entfernen von ungebundendem primärem Antikörper hin, wurden die Membranen dem sekundären Antikörper, nämlich Esel-Anti-Kaninchen Ig, das an Meerrettichperoxidase (Amersham) konjugiert worden war, in einer Verdünnung von 1:3000 ausgesetzt. Auf das Spülen zum Entfernen von ungebundenem sekundärem Antikörper hin, wurden die Membranen einem Chemilumineszenzreagenz von Amersham und Röntgenfilm ausgesetzt.

[0181] Vier von fünf Transformanten exprimierten das DHDPS-Protein. Bei den vier Transformanten, die DHDPS exprimieren, bestand eine ausgezeichnete Korrelation zwischen der Expression von GUS und DHDPS in einzelnen Samen (Tabelle 3). Aus diesem Grund sind die GUS- und DHDPS-Gene an der gleichen Stelle im Sojabohnengenom integriert. Zwei von fünf Transformanten exprimierten das AKIII-Protein und es bestand wiederum eine ausgezeichnete Korrelation zwischen der Expression von AKIII, GUS und DHDPS in einzelnen Samen (Tabelle 3). So sind bei diesen beiden Transformanten die GUS-, AKIII- und DHDPS-Gene an der gleichen Stelle in das Sojabohnengenom integriert. Ein Transformant exprimierte nur GUS in seinen Samen.

[0182] Um die freie Aminosäurezusammensetzung der Samen zu messen, wurden freie Aminosäure aus 8-10 Milligramm des Mehls in 1,0 ml Methanol/Chloroform/Wasser extrahiert, die in einem Verhältnis von 12 Vol./5 Vol./3 Vol. (MCW) bei Raumtemperatur gemischt waren. Die Mischung wurde in einer Wirbelvorrichtung behandelt und daraufhin in einer Eppendorfzentrifuge ca. 3 min lang zentrifugiert; ca. 0,8 ml der überstehenden Flüssigkeit wurden dekantiert. Dieser überstehenden Flüssigkeit wurden 0,2 ml Chloroform gefolgt von 0,3 ml Wasser zugegeben. Die Mischung wurde in der Wirbelvorrichtung behandelt und dann in einer Eppendorf-Mikrozentrifuge ca. 3 min lang zentrifugiert, die obere wässrige Phase, ca. 1,0 ml, wurde entfernt und in einem

Savant Speed Vac-Konzentrator getrocknet. Die Proben wurden in 6N Salzsäure, 0,4% β-Mercaptoethanol unter Stickstoff 24 h bei 110-120 °C hydrolysiert; 1/4 der Probe wurde auf einem Beckman Aminosäureanalysator, Modell 6300, unter Anwendung der Nachsäulen-Ninhydrinerfassung einem Arbeitsgang unterzogen. Die relativen Niveaus freier Aminosäure in den Samen wurden als Verhältnisse von Lysin oder Threonin zu Leucin verglichen, wobei Leucin so als interner Standard verwendet wurde.

[0183] Es bestand eine ausgezeichnete Korrelation zwischen Transformanten, die Corynebacteria DHDPS-Protein exprimieren und denjenigen, die höhere Niveaus an freiem Lysin aufweisen. Es wurden 20-fache bis 120-fache Erhöhungen des Niveaus an freiem Lysin in Samen beobachtet, die Corynebacteria DHDPS exprimieren. Ein hohes Niveau an Saccharopin, das auf einen Lysinkatabolismus hinweist, wurde in Samen beobachtet, die hohe Niveaus an Lysin enthielten.

[0184] Um die gesamte Aminosäurezusammensetzung von reifen Samen zu messen, wurden 1-1,4 Milligramm des Samenmehls in 6 N Salzsäure, 0,4% β-Mercaptoethanol unter Stickstoff 24 h lang bei 110-120 °C hydrolysiert; 1/50 der Probe wurde auf einem Aminosäureanalysator von Beckman, Modell 6300 unter Anwendung der Postsäulenninhydrierungserfassung einem Arbeitslauf unterzogen. Die Lysin- (und andere Aminosäure-) Niveaus in den Samen wurden als Prozentsätze der gesamten Aminosäuren verglichen.

[0185] Es bestand eine ausgezeichnete Korrelation zwischen Samen, die Corynebacteria DHDPS-Protein exprimieren und denjenigen, die hohe Niveaus an Lysin aufweisen. Es wurden Samen mit einer 5-35%-igen Erhöhung des Lysinniveaus im Vergleich der untransformierten Kontrolle beobachtet. In diesen Samen stellt Lysin 7,5-7,7% der gesamten Samenaminosäuren dar, was wesentlich höher ist, als bei irgendeinem vorher bekannten Sojabohnensamen.

TABELLE 3

Liniensamen	GUS	Freies LYS/LEU	DHDPS	AKIII	% LYS INSGESAMT
A2396-145-4	-	0,9	-	-	5,75
A2396-145-8	-	1	-	-	
A2396-145-5	-	0,8			5,85
A2396-145-3	-	1			
A2396-145-9	+	2			
A2396-145-6	+	4,6			
A2396-145-1	+	8,7			
A2396-145-10	+	18,4			7,54
A5403-175-1	+	6,2			
A5403-175-2	+	6,5			6,3
A5403-175-6	+	14,4			
A5403-175-8	+	47,8	+	-	7,67
A5403-175-10	+	124,3	+	-	7,49
A5403-181-9	+	1,4			
A5403-181-10	+	1,4	-	-	5,68
A5403-181-8	+	0,9			
A5403-181-6	+	1,5			
A5403-181-4	-	0,7	-	-	5,85
A5403-181-5	+	1,1			
A5403-181-2	-	1,8	-	-	5,59
A5403-181-3	+	2,7	-	-	5,5
A5403-181-7	+	1,9			
A5403-181-1	-	2,3			
A5403-183-9	-	0,8			
A5403-183-6	-	0,7	-	-	6,03
A5403-183-8	-	1,3			
A5403-183-4	-	1,3	-	-	6,04
A5403-183-5	+	0,9			
A5403-183-3	+	3,1			
A5403-183-1	+	3,3			
A5403-183-7	+	9,9			
A5403-183-10	+	22,3	+	+	6,74

A5403-183-2	+	23,1	+	+	7,3
A5403-196-8	-	0,9	-	-	5,92
A5403-196-6	+	8,3			
A5403-196-1	+	16,1	+	+	6,83
A5403-196-7	+	27,9			
A5403-196-3	+	52,8			
A5403-196-5	+	26			
A5403-196-2	+	16,2	+	+	
A5403-196-10	+	29	+	+	7,53
A5403-196-4	+	58,2	+	+	7,57
A5403-196-9	+	47,1			
Kontrolle vom Wildtyp	-	0,9	-	-	5,63

[0186] Es wurden achtzehn zusätzliche transformierte Sojabohnenlinien erhalten. Einzelne Samen aus den Linien wurden auf GUS-Aktivität hin, wie oben beschrieben, analysiert und alle Linien wiesen GUS positive Samen auf. Es wurde Mehl aus einzelnen Samen oder in manchen Fällen einer Ansammlung von mehreren Samen zubereitet und auf die Expression von DHDPS- und AKIII-Proteinen durch Western-Blot hin untersucht. Siebzehn der achtzehn Linien exprimierten DHDPS und fünfzehn der achtzehn exprimierten AKIII. Wiederum bestand eine ausgezeichnete Korrelation zwischen Samen, die GUS, DHDPS und AKIII exprimierten, was darauf hinweist, dass die Gene in den transformierten Linien verknüpft sind.

[0187] Die Aminosäurezusammensetzung der Samen aus diesen Linien wurde wie oben beschrieben bestimmt. Wiederum wiesen Samen, die Corynebacteria DHDPS-Protein exprimierten, erhöhte Niveaus an Lysin auf. Die Expression von DHDPS als solcher führte zu Erhöhungen des gesamten Samenlysins von 5% bis 40%. Die Expression von DHDPS zusammen mit AKIII-M4 führt zu Erhöhungen des Lysin von mehr als 400%. Eine Zusammenfassung aller verschiedener transformierten Linien ist in Tabelle 3A gezeigt.

TABELLE 3A

Liniensamen	GUS + bis -	DHDPS	AKIII	% LYS INSGESAMT
A2396-145	6 à 4	+	-	7,5
A2396-233	3 à 1	+	+	25
A2396-234	15 à 1	+	+	16
A2396-248	4 à 10	+	-	6,3
A2396-263	14 à 2	-	-	
A2396-240	7 à 1	+	+	11
A2396-267	2 à 53	+	+	8,9
A2242-273	11 à 5	+	+	13
A2242-315	6 à 2	+	+	16
A2242-316	1 à 15	+	+	12

A5403-175	7 à 3	+	+	7,6
A5403-181	7 à 3	-	-	5,7
A5403-183	6 à 4	+	+	6
A5403-185	9 à 11	+	+	7,6 P
A5403-196	9 à 1	+	+	7,6
A5403-203	6 à 36	+	+	6,1 P
A5403-204	17 à 3	+	+	8,8 P
A5403-212	13 à 5	+	+	9,4 P
A5403-214	21 à 16	+	+	32
A5403-216	14 à 4	+	-	8,2 P
A5403-218	13 à 9	+	+	9,8 P
A5403-222	12 à 27	+	+	15
A5403-225	14 à 12	+	+	13

[0188] P zeigt an, dass die Samen vor der Mehlextraktion und dem Assay gepoolt wurden

BEISPIEL 7

ISOLIERUNG EINES PFLANZENICHEN LYSINKETOGLUTARATREDUKTASE-GENS

[0189] Die Lysinketoglutaratreduktase-(LKR)Enzymaktivität ist in unreifem Endosperm von sich entwickelnden Maissamen beobachtet worden [Arruda et al. (1982) Plant Physiol. 69:988-989]. Die LKR-Aktivität steigt scharf mit dem Einsetzen der Endospermentwicklung an, erreicht einen Höhepunkt ca. 20 Tage nach der Bestäubung und nimmt dann ab [Arruda et al. (1983) Phytochemistry 22:2687-2689].

[0190] Um das Mais LKR-Gen zu klonieren, wurde RNA aus sich entwickelnden Samen 19 Tage nach der Bestäubung isoliert. Diese RNA wurde an Clontech Laboratories Ine., (Palo Alto, CA) zur genau zugeschnittenen Synthese einer cDNA-Bibliothek im Vektor Lambda Zap II geschickt. Die Umwandlung der Lambda Zap II-Bibliothek in eine Phagemidbibliothek und daraufhin in eine Plasmidbibliothek wurde dem vom Clontech bereitgestellten Protokoll gemäß durchgeführt. Nach der Umwandlung in eine Plasmidbibliothek tragen die erhaltenen gegen Ampicillin resistenten Klone die cDNA-Insertion im Vektor pBluescript SK(–). Die Expression der cDNA steht unter der Kontrolle des lacZ-Promotors am Vektor.

[0191] Es wurden zwei Phagemidbibliotheken unter Anwendung der Mischungen von Lambda Zap II-Phage und der filamentösen Helferphage von 100 µl zu 1 µl gebildet. Es wurden zwei zusätzliche Bibliotheken unter Anwendung von Mischungen von 100 µl Lambda Zap II zu 10 µl Helferphage und 20 µl Lambda Zap II 10 µl Helferphage gebildet. Die Titer der Phagemidzubereitungen waren ähnlich, gleichgültig, welche Mischung verwendet wurde, und es lagen ca. 2×10^3 gegen Ampicillin resistente Transfektanden pro ml beim E. coli-Stamm XLI-Blau als Wirt und ca. 1×10^3 bei DE126 (vergleiche unten) als Wirt vor.

[0192] Um Klone auszuwählen, die das LKR-Gen trugen, wurde ein spezifisch entworfener E. coli-Wirt, DE126, konstruiert. Die Konstruktion von DE126 erfolgte in mehreren Stufen.

(1) Ein verallgemeinerter transduzierender Stamm von Coliphage Plvir wurde durch Infizieren einer Kultur von TST1 [F^-, araD139, delta(argF-lac)205, flb5301, ptsF25, relAl, rpsL150, malE52::Tn10, decoCl, λ^-] (E. coli Genetic Stock Center #6137) unter Zuhilfenahme einer Standardmethode (bezüglich der Methoden vergleiche J. Miller, Experiments in Molecular Genetics (Versuche in der molekularen Genetic)) hergestellt.

(2) Dieser Phagenstamm wurde als Donator in einer Transduktionskreuzung (bezüglich der Methode vergleiche J. Miller, Experiments in Molecular Genetics (Versuche in der molekularen Genetic)) mit dem Stamm GIF106M1 [F^-, arg-, ilvA296, lysC1001, thrA1101, metL1000, λ^-, rpsL9, malT1, xyl-7, mtl-2, thil(?), supE44(?)] E. coli Genetic Stock Center #5074) als Empfänger verwendet. Es wurden Rekombinante an reichem Medium [mit DAP ergänztes L], das das Antibiotikum Tetracyclin enthielt, ausgewählt. Das Transposon Tn10, das Resistenz gegen Tetracyclin verleiht, wird in das malE-Gen des Stamms TST1 insertiert. Gegen Tetracyclin resistente Transduktanten, die aus dieser Kreuzung deriviert sind, enthalten wahrscheinlicherweise bis zu 2 min des E. coli-Chromosoms in der Nähe von malE. Die Gene malE und lysC werden

weniger als 0,5 Minuten, also absolut innerhalb des Transduktionsabstands, getrennt,
a. 200 gegen Tetracyclin resistente Transduktanten, wurden gründlich phänotypiert; es wurden geeignete Fermentations- und Ernährungscharakterzüge aufgezeichnet. Dem Empfängerstamm GIF106M1 mangeln Aspartokinaseisozyme aufgrund von Mutationen in thrA, metL und lysC vollständig und er erfordert deshalb die Anwesenheit von Threonin, Methionin, Lysin und Mesodiaminopimelinsäure (DAP) zum Wachstum. Es wäre zu erwarten, dass die Transduktanten, die lysC$^+$ mit malE::Tn10 aus TST1 geerbt hatten auf einem minimalen Medium wachsen, das Vitamin B1, L-Arginin, L-Isoleucin und L-Valin zusätzlich zur Glukose enthält, die als Kohlenstoff- und Energiequelle dient. Außerdem exprimieren Stämme, die die genetische Konstitution von lysC$^+$, metL- und thrA- aufweisen, nur die für Lysin empfindliche Aspartokinase. Daher sollte der Zusatz von Lysin zum Minimalmedium das Wachstum des lysC+-Rekombinanten dadurch verhindert, dass es zum Verhungern für Threonin, Methionin und DAP führt. Von den 200 untersuchten gegen Tetracyclin resistenten Transduktanten, wuchsen 49 auf dem Minimalmedium, das von Threonin, Methionin und DAP frei war. Außerdem wurden alle 49 durch Zusetzen von L-Lysin zum Minimalmedium inhibiert. Einer dieser Transduktanten wurde DE125 genannt. DE125 hat den Phänotyp von Tetracyclinresistenz, Wachstumserfordernisse für Arginin, Isoleucin und Valin und Empfindlichkeit gegen Lysin. Der Genotyp dieses Stamms ist F- malE52::Tn10 arg- ilvA296 thrA1101 metL1000 lambda-rpsL9 ma1T1 xyl-7 mtl-2 thil(?) supE44(?).
b. Dieser Schritt involviert die Herstellung eines männlichen Derivats des Stamms DE125. Der Stamm DE125 wurde mit dem männlichen AB1528 [F'16/delta (gpt-proA)62, lacY1 oder lacZ4, glnV44, galK2 rac$^-$(?), hisG4, rflid1, mgl-51, kdgK51(?), ilvC7, argE3, thi-1] (E. coli Genetic Stock Center #1528) durch die Konjugationsmethode gepaart. F'16 trägt das ilvGMEDAYC-Gencluster. Die beiden Stämmne wurden auf reichem Medium, das das Wachstum jedes Stamms erlaubt, quer ausgestrichen. Nach der Inkubation wurde die Platte mit Bezug auf ein synthetisches Medium, das Tetracyclin, Arginin, Vitamin B und Glukose enthielt, replikationsplattiert. DE125 kann auf diesem Medium nicht wachsen, weil es Isoleucin nicht synthetisieren kann. Das Wachstum von AB 1528 wird durch Einschluss des antibiotischen Tetracyclins und das Weglassen von Prolin und Histidin aus dem synthetischen Medium verhindert. Ein Fleck von Zellen wuchs auf diesem selektiven Medium.

[0193] Diese rekombinanten Zellen machten eine einzige Kolonieisolation auf dem gleichen Medium durch. Der Phänotyp eines Klons wurde dahingehend bestimmt, dass es sich um Ilv$^+$, Arg$^-$, TetR, gegen Lysin empfindlichen männlichen spezifischen (MS2)-empfindlichen Phagen handelt, was mit der einfachen Übertragung von F'16 von AB1528 auf DE125 übereinstimmt. Dieser Klon wurde DE126 genannt und weist den Genotyp F'16/malE52::Tn10, arg$^-$, ilvA296, thrA1101, metL100, lysC$^+$, λ$^-$, rpsL9, malT1, xyl-7, mtl-2, thi-1?, supE44?, auf. Er wird durch 20 µg L-Lysin in einem synthetischen Medium inhibiert.

[0194] Um Klone aus der Mais cDNA-Bibliothek auszuwählen, die das LKR-Gen tragen, wurden 100 µl der Phagemidbibliothek mit 100 µl einer Übernachtkultur von DE126, die in L-Bouillon gezüchtet worden war, gemischt und die Zellen wurden auf synthetisches Medium, das Vitamin B1, L-Arginin, Glukose als Kohlenstoff- und Energiequellen, 100 µg/ml Ampicillin und L-Lysin in einer Menge von 20, 30 oder 40 µg/ml enthielt, aufplattiert. Es wurden vier Platten mit jeder der drei verschiedenen Lysinkonzentrationen zubereitet. Es wurde erwartet, dass die Menge an Phagemid und DE126-Zellen ca. 1×10^5 gegen Ampicillin resistente Transfektanten pro Platte ergäbe. Zehn bis dreißig gegen Lysin resistente Kolonien wuchsen pro Platte (ca. 1 gegen Lysin resistente pro 5000 gegen Ampicillin resistente Kolonien).

[0195] Plasmid-DNA wurde aus 10 unabhängigen Klonen isoliert und erneut in DE126 transformiert. Sieben der zehn DNA ergaben gegen Lysin resistente Klone, was beweist, dass der gegen Lysin resistente Charakter auf dem Plasmid getragen wurde. Mehrere der klonierten DNA wurden sequenziert und biochemisch charakterisiert. Es wurde gefunden, dass die insertierten DNA-Fragmente vom E. coli-Genom anstatt einer Mais-cDNA derivierten, was anzeigt, dass die cDNA-Bibliothek, die von Clontech bereitgestellt worden war, kontaminiert war. Eine neue cDNA-Bibliothek wird deshalb zubereitet und wie oben beschrieben einem Screenen unterzogen.

BEISPIEL 8

KONSTRUKTION VON SYNTHETISCHEN GENEN IM EXPRESSIONSVEKTOR pSK5

[0196] Um die Konstruktion und Expression der unten beschriebenen synthetischen Gene zu erleichtern, war es notwendig, einen Plasmidvektor mit folgenden Attributen zu konstruieren:
1. Keine Ear I Restriktionsendonukleasestellen derart, dass die Insertion von Sequenzen eine einzige Stelle erzeugen würde.

2. Enthaltend ein Tetracyclinresistenzgen, um Verluste an Plasmid während des Wachstums und der Expression von toxischen Proteinen zu vermeiden.
3. Enthaltend ca. 290 bp vom Plasmid pBT430, einschließlich dem T7-Promotor und Terminatorsegment zum Exprimieren insertierter Sequenzen in E. coli.
4. Enthaltend einzige EcoR I- und Nco I-Restriktionsendonukleaseerkennungsstellen in der richtigen Position hinter dem T7-Promotor, um die Insertion von Oligonukleotidsequenzen zu erlauben.

[0197] Um die Attribute 1 und 2 zu erhalten, haben die Anmelder das Plasmid pSKI verwendet, das ein spontaner Mutant von pBR322 war, wobei das Ampicillingen und die Ear I-Stelle in der Nähe des Gens deletiert worden waren. Das Plasmid pSKI behielt das Tetracyclinresistenzgen, die einzigen EcoR I Restriktionsstellen an Base 1 und eine einzige Ear I-Stelle an Base 2353 bei. Zum Entfernen der Ear I-Stelle an Base 2353 von pSKI, wurde eine Polymerasekettenreaktion (PKR) unter Anwendung von pSKI als Matrize durchgeführt. Ca. 10 Femtomole pSK1 wurden mit 1 µg von jedem der Oligonukleotide SM70 und SM71 gemischt, die auf einem ABI1306B-DNA-Synthetisierer unter Anwendung der Vorgehensweisen des Herstellers synthetisiert worden waren.
SM70 5'-CTGACTCGCTGCGCTCGGTC 3' SEQ ID NO:16
SM71 5'-TA7TTTCTCCTTACGCATCTGTGC-3' SEQ ID NO:17

[0198] Die Primierstellen dieser Oligonukleotide an der pSKI-Matrize sind in **Fig. 7** gezeigt. Die PKR wurde unter Anwendung eines Perkin-Elmer Cetus-Kits (Emeryville, CA) den Anleitungen der Verkäuferfirma entsprechend auf einem Thermozykler, der von der gleichen Firma hergestellt worden war, durchgeführt. Die 25 Zyklen fanden für 1 min bei 95 °C, 2 min bei 42 °C und 12 min bei 72 °C statt. Die Oligonukleotide waren so entworfen, dass sie die Replikation des gesamten pSKI-Plasmids ausschließlich eines Fragments von 30 b um die Ear I-Stelle herum (man vergleiche **Fig. 7**) primieren. 10 Mikroliter des Reaktionsprodukts von 100 µl wurden auf einem 1%-igen Agarosegel einem Arbeitslauf unterworfen und mit Ethidiumbroimid gefärbt, um eine Bande von ca. 3,0 kb zum Vorschein zu bringen, die der vorausgesagten Größe des replizierten Plasmids entsprach.

[0199] Der Rest der PKR-Reaktionsmischung (90 µl) wurde mit 20 µl von 2,5 mm Desoxynukleotidtriphosphaten (dATP, dTTP, dGTP und dCTP) gemischt, 30 Einheiten Klenowenzym wurde zugegeben und die Mischung wurde bei 37 °C 30 min lang, gefolgt von 65 °C für 10 min inkubiert. Das Klenowenzym wurde verwendet, um die zerfetzten Enden, die durch die PKR gebildet worden waren, zu füllen. Die DNA wurde durch Ethanol ausgefällt, mit 70% Ethanol gewaschen, unter Vakuum getrocknet und erneut in Wasser suspendiert. Die DNA wurde dann mit T4 DNA-Kinase in Gegenwart von 1 mM ATP in Kinasepuffer behandelt. Diese Mischung wurde dann 30 min lang bei 37 °C, gefolgt von 10 min bei 65 °C, inkubiert. 10 µl der kinasierten Zusammensetzung wurden 2 µl 5X Ligationspuffer und 10 Einheiten der T4 DNA-Ligase zugesetzt. Die Ligation wurde 16 h lang bei 15 °C durchgeführt. Auf die Ligation hin wurde die DNA halbiert und eine Hälfte mit Ear I-Enzym digeriert. Die Klenow-, Kinase-, Ligations- und Restriktionsendonukleasereaktionen wurden wie bei Sambrook et al., [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Ausgabe (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press] beschrieben, durchgeführt. Klenow-, Kinase-, Lipase- und die meisten Restriktionsendonukleasen wurden von BRI erworben. Einige Restriktionsendonukleasen wurden von NEN Biolabs (Beverley, MA) oder Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN) erworben. Beide ligierten DNA-Proben wurden getrennt in kompetente JM 103-[supE thi del (lac-proAB) F' (traD36 porAB, lacIq lacZ del M15] Restriktion minus Zellen] unter Anwendung der $CaCl_2$-Methode, wie bei Sambrook et al [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Ausgabe (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press] beschrieben, transformiert und auf Medien plattiert, die 12,5 µ/ml Tetracyclin enthielten. Mit oder ohne Ear I-Digestion, wurde die gleiche Anzahl von Transformanten gewonnen, was darauf hinweist, dass die Ear I-Stelle von diesen Konstrukten entfernt worden war. Die Klone wurden durch Zubereiten von DNA durch das alkalische Lyse-Miniprep-Verfahren, wie bei Sambrook et al. [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Ausgabe (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press] beschrieben, gefolgt von einer Restriktionsendonukleasedigestionsanalyse, gescreent. Ein einziger Klon wurde gewählt, der gegen Tetracyclin widerstandsfähig war und keine Ear I-Stellen enthielt. Dieser Vektor wurde pSK2 genannt. Die verbleibende EcoR I-Stelle von pSK2 wurde durch Digerieren des Plasmids mit EcoR I bis zum Abschluss, Füllen der Enden mit Klenow und Ligieren zerstört. Ein Klon, der keine EcoR I-Stelle enthielt, wurde pSK3 genannt.

[0200] Um die obigen Attribute 3 und 4 zu erhalten, wurde das bakteriophage T7 RNA-Polymerasepromotor/Terminatorsegment vom Plasmid pBT430 (vergleiche Beispiel 2) durch PKR amplifiziert. Die Oligonukleotidprimer SM78 (SEQ ID NO:18) und SM79 (SEQ ID NO:19) wurden so konstruiert, dass sie ein 300b-Fragment von pBT430, das die 77 Promotor/Terminatorsequenzen überspannt, primiert (vergleiche **Fig. 7**).
SM78 5'-TTCATCGATAGGCGACCACACCCGTCC-3' SEQ ID NO:18
SM79 5'-AATATCGATGCCACGATGCGTCCGGCG-3' SEQ ID NO:19

[0201] Die PKR-Reaktion wurde wie oben beschrieben unter Anwendung von pBT430 als Matrize durchgeführt und es wurde ein Fragment von 300 bp gebildet. Die Enden des Fragments wurden unter Anwendung von Klenow-Enzym gefüllt und wie oben beschrieben kinasiert. DNA aus dem Plasmid pSK3 wurde vollständig mit PvuII-Enzym digeriert und dann mit alkalischer Kalbdarmphosphatase (Boehringer Mannheim) zum Entfernen des 5'-Phosphats behandelt. Der Vorgang war wie bei Sambrook et al. [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Ausgabe (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press] beschrieben. Die geschnittene und phosphatasierte pSK3-DNA wurde durch Ausfällen mit Ethanol gereinigt und ein Teil wurde in einer Ligationsreaktion mit dem durch PKR gebildeten Fragment, das die T7-Promotorsequenz enthält, gereinigt. Die Ligationsmischung wurde zu JM103 [supE thi del (lac-proAB) F'[traD36 porAB, lacIq lacZ del M15] Restriktion minus] transformiert und gegen Tetracyclin widerstandsfähige Kolonien wurden gescreened. Plasmid-DNA wurde durch die alkalische Lyse-Miniprepmethode zubereitet und es wurde eine Restriktionsendonukleaseanalyse durchgeführt, um die Insertion und Orientierung des PKR-Produkts zu erfassen. Zwei Klone wurden zur Sequenzanalyse ausgewählt: beim Plasmid pSKS war das Fragment in der in Fig. 7 gezeigten Orientierung vorhanden. Die an alkalischer denaturierter doppelstrangiger DNA unter Anwendung von Sequenase® T7-DNA-Polymerase (US Biochemical Corp) und des vom Hersteller vorgeschlagenen Protokolls durchgeführte Sequenzanalyse brachte zum Vorschein, dass pSKS keine PKR-Replikationsfehler innerhalb der T7-Promotor/Terminatorsequenz aufwies.

[0202] Die Strategie zur Konstruktion wiederholter synthetischer Gensequenzen auf der Basis der EAR I-Stelle ist in Fig. 8 gezeigt. Der erste Schritt bestand aus der Insertion einer Oligonukleotidsequenz, die ein Basengen von 14 Aminosäuren kodiert. Diese Oligonukleotidinsertion enthielt eine einzige Ear I-Restriktionsstelle für die darauffolgende Insertion von Oligonukleotiden, die ein oder mehrere Heptadwiederholungen kodieren und fügte eine einzige Asp 718-Restriktionsstelle zur Verwendung beim Übertragen von Gensequenzen auf Pflanzenvektoren hinzu. Die überhängenden Enden des Oligonukleotidsatzes erlaubten die Insertion in die einzigen Nco I und EcoR I-Stellen des Vektors pSKS.

```
                    M  E  E  K  M  K  A  M  E  E  K
SM81          5'-CATGGAGGAGAAGATGAAGGCGATGGAAGAGAAG
SM80              3'-CTCCTCTTCTACTTCCGCTACCTTCTCTTC
                  NCO I                     EAR I


                M  K  A                     (SEQ ID NO:22)
SM81          ATGAAGGCGTGATAGGTACCG-3'      (SEQ ID NO:20)
SM80          TACTTCCGCACTATCCATGGCTTAA-5'  (SEQ ID NO:21)
                          ASP718 ECOR I
```

[0203] DNA aus dem Plasmid pSKS wurde vollständig mit Nco I und EcoR I-Restriktionsendonukleasen digeriert und durch Agarosegelelektrophorese gereinigt. Gereinigte DNA (0,1 µg) wurde mit 1 µg jeweils des Oligonukleotids SM80 (SEQ ID NO:14) und SM81 (SEQ ID NO:13) gemischt und ligiert. Die Ligationsmischung wurde in den E. coli-Stamm JM103 [supE thi del (lac-proAB) F' (traD36 porAB, lacIq lacZ del M15] Restriktion minus] transformiert und gegen Tetracyclin widerstandsfähige Transformanten wurden durch Hochgeschwindigkeitsplasmid-DNA-Zubereitungen, gefolgt von der Restriktionsverdaungsanalyse gescreened. Ein Klon wurde gewählt, der jeweils eine von Ear I, Nco I, Asp 718 und EcoR I-Stellen aufwies, was die richtige Insertion der Oligonukleotide anzeigt. Dieser Klon wurde pSK6 genannt (Fig. 9). Das Sequenzieren der Region von DNA auf den T7-Protor hin bestätigte die Insertion von Oligonukleotiden der erwarteten Sequenz.

[0204] Repetitive Heptadkodiersequenzen wurden dem Basengenkonstrukt des oben Beschriebenen durch Bilden von Oligonukleotidpaaren hinzugefügt, die direkt in die einzige Ear I-Stelle des Basengens ligiert werden konnten. Die Oligonukleotide SM84 (SEQ ID NO:23) und SM85 (SEQ ID NO: 24) kodieren Wiederholungen des SSPS-Heptads. Die Oligonukleotide SM82 (SEQ ID NO:25) und SM83 (SEQ ID NO:26) kodieren Wiederholungen des SSP7-Heptads.

SSP5	M E E K M K A	(SEQ ID NO:28)
SM84	5'-GATGGAGGAGAAGATGAAGGC-3'	(SEQ ID NO:23)
SM85	3'- CCTCCTCTTCTACTTCCGCTA-5'	(SEQ ID NO:24)

SSP7	M E E K L K A	(SEQ ID NO:27)
SM82	5'-GATGGAGGAGAAGCTGAAGGC-3'	(SEQ ID NO:25)
SM83	3'- CCTCCTCTTCGACTTCCGCTA-5'	(SEQ ID NO:26)

[0205] Es wurden Oligunkleotidsätze ligiert und gereinigt, um DNA-Fragmente, die multiple Heptadwiederholungen kodieren, zur Insertion in den Expressionvektor zu erhalten. Oligonukleotide aus jedem Satz von insgesamt ca. 2 µg wurden kinasiert und 2 h lang bei Raumtemperatur ligiert. Die ligierten Multimere der Oligonukleotidsätze wurden auf einem 18%-igen nichtdenaturierenden Polyacrylamidgel von 20 × 20 × 0,015 cm (Acrylamid: Bisacrylamid = 19:1) getrennt. Multimere Formen die sich auf dem Gel als 168 bp (8n) oder größer abtrennen, wurden durch Schneiden eines kleinen Stücks Polyacrylamid, das die Bande enthält, in feine Stückchen, Zugeben von 1,0 ml 0,5 M Ammoniumacetat, 1 mM EDTA (pH-Wert 7,5) und Rotieren der Röhre bei 37 ° über Nacht gereinigt. Das Polyacrylamid wurde durch Zentrifugieren heruntergeschleudert, 1 µg tRNA wurde der überstehenden Substanz zugegeben, die DNA-Fragmente wurden mit 2 Volumen Ethanol bei –70 ° ausgefällt, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und erneut in 10 µl Wasser suspendiert.

[0206] Zehn Mikrogramm pSK6 DNA wurden vollständig mit Ear I-Enzym digeriert und mit alkalischer Kalbsdarmphosphatase behandelt. Die geschnittene und phosphatasierte Vektor-DNA wurde auf die Elektrophorese hin in einem Agarosegel von niedrigem Schmelzpunkt durch Ausschneiden der bandenförmigen DNA, Verflüssigen der Agarose bei 55 ° und Reinigen über NACS PREPAC™ Säulen (BRL) den vom Hersteller vorgeschlagenen Vorgehensweisen entsprechend, isoliert. Ca 0,1 µg gereinigte, durch Ear I digerierte und mit Phosphatase behandelte pSK6-DNA wurde mit 5 µl der mit Gen gereinigten multimeren Oligonukleotidsätze gemischt und ligiert. Die ligierte Mischung wurde in den E. coli-Stamm JM103 (supE thi del (lac-proAB) F' (traD36 porAB, lacIq lacZ del M15) Restriktion minus] transformiert und es wurden gegen Tetracyclin widerstandsfähige Kolonien ausgewählt. Die Klone wurden durch Restriktionsdigeste von Schnellplasmidprep-DNA gescreent, um die Länge der insertierten DNA zu bestimmen. Restriktionsendonukleaseanalysen wurden gewöhnlich durch Digerieren der Plasmid-DNA mit Asp 718 und Bgl II, gefolgt vom Trennen von Fragmenten auf 18%-igen nichtdenaturierten Polyacrylamidgelen, gereinigt. Beim Sichtbarmachen der Fragmente mit Ethidiumbromid kam zum Vorschein, dass ein Fragment von 150 bp gebildet wurde, wenn nur das Basengensegment vorlag. Insertionen der Oligonukleotidfragmente erhöhten diese Größe um Mehrfache von 21 Basen. Aus diesem gescreenten Material wurden mehrere Klone für die DNA-Sequenzanalyse und Expression von kodierten Sequenzen in E. coli ausgewählt. Die ersten und letzten SSPS-Heptade, die die Sequenz jedes Konstrukts flankieren, stammen aus dem oben beschriebenen Basengen. Die Insertionen sind durch Unterstreichen (Tabelle 4) angegeben.

TABELLE 4 – SEQUENZ DURCH HEPTAD

Klon #	SEQ ID NO:	Sequenz durch Heptad Aminosäurewiderholung (SSP)	SEQ ID NO:
C15	29	5.7.7.7.7.7.5	30
C20	31	5.7.7.7.7.7.5	32
C30	33	5.7.7.7.7.5	34
D16	35	5.5.5.5	36
D20	37	5.5.5.5.5	38
D33	39	5.5.5.5	40

[0207] Da die Gelreinigung der oligomeren Formen der Oligonukleotide nicht die erwartete Anreicherung längerer (d.h. > 8n) Insertionen ergab, wandten die Anmelder eine andere Vorgehensweise für eine darauffolgende Runde von Insertionskonstruktionen an. Für diese Serie von Konstrukten wurden vier weitere Sätze von Oligonukleotiden gebildet, die jeweils SSP 8, 9, 10 und 11 Aminosäuresequenzen kodieren:

```
SSP8            M  E  E  K  L  K  K        (SEQ ID NO:49)
SM86       5'-GATGGAGGAGAAGCTGAAGAA-3'     (SEQ ID NO:41)
SM87       3'-   CCTCCTCTTCGACTTCTTCTA-5'   (SEQ ID NO:42)


SSP9            M  E  E  K  L  K  W        (SEQ ID NO:50)
SM88       5'-GATGGAGGAGAAGCTGAAGTG-3'     (SEQ ID NO:43)
SM89       3'-   CCTCCTCTTCGACTTCACCTA-5'   (SEQ ID NO:44)


SSP10           M  E  E  K  M  K  K        (SEQ ID NO:51)
SM90       5'-GATGGAGGAGAAGATGAAGAA-3'     (SEQ ID NO:45)
SM91       3'-   CCTCCTCTTCTACTTCTTCTA-5'   (SEQ ID NO:46)


SSP11           M  E  E  K  M  K  W        (SEQ ID NO:52)
SM92       5'-GATGGAGGAGAAGATGAAGTG-3'     (SEQ ID NO:47)
SM93       3'-   CCTCCTCTTCTACTTCACCTA-5'   (SEQ ID NO:48)
```

[0208] Das folgende HPLC-Verfahren wurde zum Reinigen multimerer Formen der Oligonukleotidsätze nach dem Kinasieren und Ligieren der Oligonukleotide, wie oben beschrieben, angewendet. Es wurde eine Chromatographie auf einem Hewlett Packard Flüssigchromatographeninstrument, Modell 1090M, durchgeführt. Die Ausflussextinktion wurde bei 260 nm überwacht. Ligierte Oligonukleotide wurden 5 min lang bei 12.000 xg zentrifugiert und in eine TSK DEAE-NPR-Ionenaustauschsäule von 2,5 µ (Innendurchmesser 35 cm × 4,6 mm), die mit einem In-line-Filter von 0,5 µ (Supelco) ausgestattet war, zentrifugiert. Die Oligonukleotide wurden aufgrund der Länge unter Anwendung einer Gradientenelution und einer mobilen Zwei-Pufferphase [Puffer A: 25 mM Tris-C., pH-Wert 9,0 und Puffer B: Puffer A + 1M NaCl] getrennt. Beide Puffer A und B wurden vor der Anwendung durch Filter von 0,2 µ hindurchgeführt.

[0209] Es wurde folgendes Gradientenprogramm mit einer Fließrate von 1 ml pro min bei 30 °C angewendet.

Zeit	% A	% B
zu Beginn	75	25
0,5 Minuten	55	45
5 Minuten	50	50
20 Minuten	38	62
23 Minuten	0	100
30 Minuten	0	100
31 Minuten	75	25

[0210] Bruchteile (500 µl) wurden zwischen 3 min und 9 min aufgefangen. Die Fraktionen, die der Länge zwischen 120 bp und 2000 bp entsprachen, wie durch die Kontrolltrennungen von Restriktionsdigesten von Plasmid-DNA bestimmt, werden gepoolt.

[0211] Die 4,5 ml gepolter Fraktionen für jeden Oligonukleotidsatz wurden durch Zugeben von 10 µg tRNA und 9,0 ml Ethanol ausgefällt, zweimal mit 70% Ethanol gespült und erneut in 50 µl Wasser suspendiert. Zehn Mikroliter der erneut suspendierten, durch HPLC gereinigten Oligonukleotide wurden 0,1 µg der oben beschriebenen, von Ear I geschnittenen, phosphatasierten pSK6-DNA zugegeben und über Nacht bei 15 °C ligiert. Alle sechs oben beschriebenen Oligonukleotidsätze, die kinasiert und selbstligiert, jedoch nicht durch Gel oder HPLC gereinigt worden waren, wurden ebenfalls in einzelnen Ligationsreaktionen mit dem pSK6-Vektor verwendet. Die Ligationsmischungen wurden in den E. coli-Stamm DHSa [supE44 del lacU169 (phi 80 lacZ del M15) hsdR17 recA] endA1 end196 thil relA1] transformiert und es wurden gegen Tetracyclin widerstandsfähige Kolonien ausgewählt. Die Anmelder entschlossen sich, den DH5α- [supE44 del lacU169 (phi 80 lacZ del M15) hsdR17 recA1 endA1 gyr196 thil relA1] Stamm für alle darauffolgenden Arbeiten zu wählen, weil dieser Stamm eine sehr hohe Transformationsrate aufweist und recA- ist. Der recA-Phänotyp eliminiert Bedenken, dass diese repetitiven DNA-Struktwen Substrate für eine homologe Rekombination sein könnten, die zur Deletion multimerer Sequenzen führt.

[0212] Es wurden Klone wie oben beschrieben gescreened. Mehrere Klone wurden ausgewählt, um Insertionen jedes der sechs Oligonukleotidsätze darzustellen. Die ersten und letzten SSP-Heptade, die die Sequenz flankieren, stellen die Basengensequenz dar. Die insertierten Sequenzen sind unterstrichen. Die Klonzahlen, die den Buchstaben „H" einschließen, bezeichnen durch HPLC gereinigte Oligonukleotide (Tabelle 5).

TABELLE 5

Klon #	SEQ ID NO:	Sequenz durch Heptad Aminosäurewiderholung (SSP)	SEQ ID NO:
82-4	53	7.7.7.7.7.7.5	54
84-H3	55	5.5.5.5	56
86-H23	57	5.8.8.5	58
88-2	59	5.9.9.9.5	60
90-H8	61	5.10.10.10.5	62
92-2	63	5.11.11.5	64

[0213] Der Verlust der ersten Basengenwiederholung in Klon 82-4 kann aus der homologen Rekombination zurischen den Basengenwiederholungen 5.5 herrühren, bevor der Vektor pSK6 in den recA-Stamm überführt worden war. Das HPLC-Verfahren verbesserte die Insertion langer multimerer Formen der Oligonukleotidsätze in das Basengen nicht, sondern diente als effiziente Reinigung der ligierten Oligonukleotide.

[0214] Es wurden Oligonukleotide konstruiert, die Mischungen der SSP-Sequenzen kodieren und die die Codonanwendung soweit wie möglich variierten. Dies erfolgte, um die Möglichkeit der Deletion repetitiver Insertionen durch Rekombination zu reduzieren, sobald die synthetischen Gene zu Pflanzen transformiert wurden, und um die Länge der konstruierten Gensegmente zu vergrößern. Diese Oligonukleotide kodieren vier Wieder-

holungen von Heptadkodiereinheiten (20 Aminosäurereste) und können an der einzigen Ear I-Stelle in irgendeinem der vorher konstruierten Klone insertiert werden. SM96 und SM97 kodieren $SSP(5)_4$, SM98 und SM99 kodieren $SSP(7)_4$ und SM100 plus SM101 kodieren SSP8.9.8.9.

```
                        M  E  E  K  M  K  A  M  E  E  K  M  K
      SM96          5'-GATGGAGGAAAAGATGAAGGCGATGGAGGAGAAAATGAAA
      SM97          3'    CCTCCTTTTCTACTTCCGCTACCTCCTCTTTTACTTT
 A  M  E  E  K  M  K  A  M  E  E  K  M  K  A          (SEQ ID NO:67)
GCTATGGAGGAAAAGATGAAAGCGATGGAGGAGAAAATGAAGGC-3'      (SEQ ID NO:65)
CGATACCTCCTTTTCTACTTTCGCTACCTCCTCTTTTACTTCCGCTA-5'   (SEQ ID NO:66)
```

```
                     M  E  E  K  L  K  A  M  E  E  K  L  K
    SM98          5'-GATGGAGGAAAAGCTGAAAGCGATGGAGGAGAAACTCAAG
    SM99          3'    CCTCCTTTTCGACTTTCGCTACCTCCTCTTTGAGTTC
 A  M  E  E  K  L  K  A  M  E  E  K  L  K  A          (SEQ ID NO:70)
GCTATGGAAGAAAAGCTTAAAGCGATGGAGGAGAAACTGAAGGC-3'      (SEQ ID NO:68)
CGATACCTTCTTTTCGAATTTCGCATCCTCCTCTTTGACTTCCGCTA-5'   (SEQ ID NO:69)
```

```
                     M  E  E  K  L  K  K  M  E  E  K  L  K
    SM100         5'-GATGGAGGAAAAGCTTAAGAAGATGGAAGAAAAGCTGAAA
    SM101         3'    CCTCCTTTTCGAATTCTTCTACCTTCTTTTCGACTTT
 W  M  E  E  K  L  K  K  M  E  E  K  L  K  W          (SEQ ID NO:73)
TGGATGGAGGAGAAACTCAAAAAGATGGAGGAAAAGCTTAAATG-3'      (SEQ ID NO:71)
ACCTACCTCCTCTTTGAGTTTTTCATCCTCCTTTTCGAATTTACCTA-5'   (SEQ ID NO:72)
```

[0215] DNA aus den Klonen 82-4 und 84-H3 wurden vollständig mit Ear I-Enzym digeriert, mit Phosphatase behandelt und mit Gel gereinigt. Ca. 0,2 µg dieser DNA wurden mit 1,0 µg jedes der Oligonukleotidsätze SM96 und SM97, SM98 und SM99 oder SM100 und SM101 gemischt, die vorher kinasiert worden waren. Die DNA und Oligonukleotide wurden über Nacht ligiert und dann wurden die Ligationsmischungen in den E. coli-Stamm DHSa transformiert. Gegen Tetracyclin widerstandsfähige Kolonien wurden wie oben auf das Vorliegen der Oligonukleotidinsertionen hin gescreened. Es wurden Klone für die Sequenzanalyse aufgrund ihrer Restriktionsendonukleasedigestionsbildern (Tabelle 6) gewählt.

TABELLE 6

Klon #	SEQ ID NO:	Sequenz durch Heptad Aminosäurewiderholung (SSP)	SEQ ID NO:
2-9	74	7.7.7.7.7.7.8.9.8.9.5	75
3-5	78	7.7.7.7.7.7.5.5	79
5-1	76	5.5.5.7.7.7.5	77

[0216] Insertierte Oligonukleotidsegmente sind unterstrichen.

[0217] Der Klon 2-9 wurde aus den Oligonukleotiden SM100 (SEQ ID NO:71) und SM101 (SEQ ID NO:72) deriviert, die in die Ear I-Stelle des Klons 82-4 ligiert worden waren (vergleiche oben). Der Klon 3-5 (SEQ ID NO:78) wurde aus der Insertion der ersten 22 Basen des Oligonukleotidsatzes SM96 (SEQ ID NO:65) und SM97 (SEQ ID NO:66) in die Ear I-Stelle des Klons 82-4 (SEQ ID NO:53) deriviert. Diese teilweise Insertion kann ein unrichtiges Annealing dieser äußerst repetitiven Oligos widerspiegeln. Der Klon 5-1 (SEQ ID NO:76)

wurde aus den Oligonukleotiden SM98 (SEQ ID NO:68) und SM99(SEQ ID NO:69) deriviert, die in die Ear I-Stelle des Klons 84-H3 (SEQ ID NO:55)ligiert worden waren (vergleiche Abschnitt).

STRATEGIE II

[0218] Eine zureite Strategie für die Konstruktion synthetischer Gensequenzen wurde durchgeführt, um eine größere Flexibilität sowohl bei der DNA als auch der Aminosäuresequenz zu gestatten. Diese Strategie ist in Fig. 10 und **Fig.** 11 dargestellt. Der erste Schritt bestand aus der Insertion einer Oligonukleotidsequenz, die ein Basengen von 16 Aminosäuren kodiert, in den Originalvektor pSKS. Diese Oligonukleotidinsertion enthielt eine einzige Ear I-Stelle, wie im vorherigen Basengenkonstrukt, zur Verwendung bei darauffolgenden Insertion von Oligonukleotiden, die eine oder mehrere Heptadwiederholungen kodieren. Das Basengen umfasst auch eine BspH I-Stelle am 3'-Terminus. Die überhängenden Enden dieser Spaltungsstelle sind so konstruiert, dass sie „in frame"-Proteinfusionen unter Anwendung von Nco I-Überhängungsenden gestatten. Aus diesem Grund können Gensegmente durch Anwendung der in **Fig.** 11 beschriebenen Duplikationsschemen multipliziert werden. Die überhängenden Enden des Oligonukleotidsatzes erlauben die Insertion in die einzigen Nco 1 und EcoR I-Stellen des Vektors pSKS.

```
                  M  E  E  K  M  K  K  L  E  E  K
SM107       5'-CATGGAGGAGAAGATGAAAAAGCTCGAAGAGAAG
SM106            3'-CTCCTCTTCTACTTTTTCGAGCTTCTCTTC
                 NCO I                    EAR I

                  M  K  V  M  K                    (SEQ ID NO:82)
                 ATGAAGGTCATGAAGTGATAGGTACCG-3'     (SEQ ID NO:80)
                 TACTTCCAGTACTTCACTATCCATGGCTTAA-5'  (SEQ ID NO:81)
                        BSPH I  ASP 718
```

[0219] Der Oligonukleotidsatz wurde in den pSKS-Vektor, wie oben unter Strategie I beschrieben, insertiert. Das dabei entstehende Plasmid wurde mit PSK34 bezeichnet.

[0220] Oligonukleotidsätze, die 35 Aminosäure-„Segmente" kodieren, wurden in die einzige Ear I-Stelle des pSK34-Basengens unter Anwendung von Verfahren wie oben beschrieben, ligiert. In diesem Fall wurden die Oligonukleotide nicht durch Gel oder HPLC gereinigt, sondern einfach einem Annealing unterworfen und in den Ligationsreaktionen verwendet. Die folgenden Oligonukleotidsätze wurden verwendet:

SEG 3 L E E K M K A M E D K M K W

SM110 5'-GCTGGAAGAAAAGATGAAGGCTATGGAGGACAAGATGAAATGG

SM111 3'-CCTTCTTTTCTACTTCCGATACCTCCTGTTCTACTTTACC

L E E K M K K (SEQ ID NO:85)
(acides aminés 8-28)

CTTGAGGAAAAGATGAAGAA-3' (SEQ ID NO:83)

GAACTCCTTTTCTACTTCTTCGA-5' (SEQ ID NO:84)

SEG 4 L E E K M K A M E D K M K W

SM112 5'-GCTCGAAGAAAGATGAAGGCAATGGAAGACAAAATGAAGTGG

SM113 3'-GCTTCTTTCTACTTCCGTTACCTTCTGTTTTACTTCACC

L E E K M K K (SEQ ID NO:86)
(acides aminés 8-28)

CTTGAGGAGAAAATGAAGAA-3' (SEQ ID NO:87)

GAACTCCTCTTTTACTTCTTCGA-5' (SEQ ID NO:88)

SEG 5 L K E E M A K M K D E M W K

SM114 5'-GCTCAAGGAGGAAATGGCTAAGATGAAAGACGAAATCTGGAAA

SM115 3'-GTTCCTCCTTTACCGATTCTACTTTCTGCTTTACACCTTT

L K E E M K K (SEQ ID NO:89)
(acides aminés 8-28)

CTGAAAGAGGAAATGAAGAA (SEQ ID NO:90)

GACTTTCTCCTTTACTTCTTCGA (SEQ ID NO:91)

[0221] Es wurden Klone auf das Vorliegen der insertierten Segmente hin durch Restriktionsdigestion gefolgt vom Trennen von Fragmenten auf 6% Acrylamidgelen gescreened. Die richtige Insertion von Oligonukleotiden wurde durch DNA-Sequenzanalysen bestätigt. Klone, die jeweils die Segmente 3, 4 und 5 enthielten, wurden pSKseg3, pSKseg4 und pSKsegS genannt.

[0222] Diese „Segment"-Klone wurden bei einem Duplikationsschema, wie in **Fig.** 11 gezeigt, angewendet. 10 µg des Plasmids pSKseg3 wurden vollständig mit Nhe I und BspH I digeriert und das Fragment von 1503 bp wurde von einem Agarosegel unter Anwendung der Whatmannpapiertechnik isoliert. Zehn µg des Plasmids pSKseg4 wurden vollständig mit Nhe I und Nco I digeriert und die Bande von 2109 bp durch Gel isoliert. Gleiche Mengen dieser Fragmente wurden ligiert und Rekombinanten auf Tetracyclin ausgewählt. Es wurden Klone durch Restriktionsdigestionen gescreened und ihre Sequenzen bestätigt. Das dabei entstehende Plasmid wurde pSKseg34 genannt.

[0223] pSKseg34- und pSKsegS-Plasmid-DNA wurden digeriert, Fragmente isoliert und auf ähnliche Weise wie oben unter Bildung eines Plasmids ligiert, das DNA-Sequenzen enthielt, die das an die Segmente 3 und 4 fusionierte Segment 5 kodieren. Dieses Konstrukt wurde pSKseg534 genannt und kodiert die folgende Aminosäuresequenz.

SSP534 NH2-MEEKMKKLKEEMAKMKDEMWKLKEEMKKLEEKMKVMEEKMKKLEEKMKA

MEDKMKWLEEKMKKLEEKMKVMEEKMKKLEEKMKAMEDKMKWLEEKMKK

LEEKMKVMK-COOH (SEQ ID NO:92)

BEISPIEL 9

KONSTRUKTION VON CHIMÄREN SSP-GENEN ZUR EXPRESSION IN DEN SAMEN VON PFLANZEN

[0224] Um die in Beispiel 8 beschriebenen synthetischen Genprodukte in Pflanzensamen zu exprimieren, wurden die Sequenzen in die Samenpromotorvektoren CW108, CW109 oder ML113 (Fig. 12) übertragen. Die Vektoren CW108 und ML113 enthalten den Bohnenphaseolinpromotor (von Base +1 bis Base –494) und 1191 Basen der 3'-Sequenzen aus Bohnenphaseolingen. CW109 enthält den Sojabohnen-β-Conglycininpromotor (von Base +1 bis Base –619) und die gleichen 1191 Basen von 3'-Sequenzen aus dem Bohnenphaseolingen. Diese Vektoren wurden so konstruiert, dass sie das direkte Klonieren von Kodiersequenzen in einzige Nco I- und Asp 718-Stellen gestatten. Diese Vektoren bieten auch Stellen (Hind III oder Sal I) an den 5'- und 3'-Enden, um die Übertragung der Promotor/Kodienegion/3'-Sequenzen direkt auf geeignete binäre Vektoren zu gestatten.

[0225] Um die synthetischen Speicherproteingensequenzen zu insertieren, wurden 10 µg Vektor-DNA vollständig mit Asp 718- und Nco I-Restriktionsendonukleasen digeriert. Der linearisierte Vektor wurde durch Elektrophorese auf einem 1,0%-igen Agarosegel über Nacht bei 15 Volt gereinigt. Das Fragment wurde durch Schneiden der Agarose vor der Bande, Eingeben eines 10 × 5 mm großen Stücks Whatmann 3 MM-Papier in die Agarose und Behandeln des Fragments durch Elektrophorese auf dem Papier aufgefangen [Errington (1990) Nukleic Acids Research, 18:17]. Das Fragment und der Puffer wurden durch Zentrifugieren aus dem Papier herausgeschleudert und die DNA in den –100 µl wurde durch Zugeben von 10 mg tRNA, 10 µl 3 M Natriumacetat und 200 µl Ethanol ausgefällt. Die ausgefällte DNA wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Das DNA-Fragment wurde erneut in 20 µl Wasser suspendiert und ein Teil 10fach zur Verwendung bei Ligationsreaktionen verdünnt.

[0226] Plasmid-DNA (10 mg) aus den Klonen 3-5 und pSK534 wurden vollständig mit Asp 718- und Nco I-Restriktionsendonukleasen digeriert. Die Digestionsprodukte wurden auf einem 18%-igen nichtdenaturierenden Polyacrylamidgel, wie in Beispiel 8 beschrieben, getrennt. Gelstücke, die die erwünschten Fragmente enthielten, wurden von dem Gel abgeschnitten und durch Eingeben der Gelstücke in ein 1%-iges Agarosegel und Behandeln durch Elektrophorese für 20 min bei 100 Volt gereinigt. DNA-Fragmente wurde auf 10 × 5 mm großen Stücken von Whatmann 3 MM-Papier aufgefangen, der Puffer und die Fragmente wurden durch Zentrifugieren herausgeschleudert und die ausgefällte DNA mit Ethanol ausgefällt. Die Fragmente wurden erneut in 6 µl Wasser suspendiert. Ein Mikroliter des oben beschriebenen verdünnten Vektorfragments, 2 µl 5 × Ligationspuffer und 1 µl T4 DNA-Ligase wurden zugegeben. Die Mischung wurde über Nacht bei 15 °C ligiert.

[0227] Die Ligationmischungen wurden in den E. coli-Stamm DHSa [supE44 del lacU169 (phi 80 lacZ del M15) hsdR17 recA1 endA1 gyr196 thil relA1] transformiert und es wurden gegen Ampicillin widerstandsfähige Kolonien ausgewählt. Die Klone wurden durch Restriktionsendonukleasedigestionsanalysen schneller Plasmid-DNA und durch DNA-Sequenzieren gescreent.

BEISPIEL 10

TABAKPFLANZEN, DIE DIE CHIMÄREN GENE PHASEOLINPROMOTOR/CTS/ECODAPA, PHASEOLIN PROMOTOR/CTS/LYSC-M4 UND β-CONGLYCIN-PROMOTOR7SSP3-5 ENTHALTEN

[0228] Der binäre Vektor pZS97 wurde zum Übertragen des chimären SSP3-5-Gens aus Beispiel 9 und der chimären E. coli dapA- und lysC-M4-Gene aus Beispiel 4 auf Tabakpflanzen angewendet. Der binäre Vektor pZS97 (Fig. 13) ist ein Teil des binären Ti-Plasmidvektorsystems [Bevan, (1984) Nucl. Acids. Res. 12:8711-8720] von Agrobactrium tumefaciens. Der Vektor enthält: (1) die Norpalinsynthase des chimären Gens:: Neomycinphosphotransferase (nos::NPTII) als auswählbaren Marker für transformierte Pflanzenzellen [Bevan et al., (1983) Nature 304:184-186], (2) die linken und rechten Ränder der T-DNA des Ti-Plasmids [Bevan, (1984) Nucl. Acids. Res. 12:8711-8720], (3) das E. coli LacZ a-Komplementiersegment [Viering et al., (1982) Gene 19:259-267] mit einer einzigen Sal I-Stelle (pSK97K) oder einer einzigen Hind III-Stelle (pZS97) in der Polylinkerregion, (4) den Bakterienreplikationsursprung aus dem Pseudomonasplasmid pVS1 [Itoh et al., (1984) Plasmid 11:206-220] und (5) das Bakterien-β-lactamasegen als auswählbaren Marker für transformiertes A. tumefaciens.

[0229] Die Plasmid pZS97-DNA wurde vollständig mit Hind III-Enzym digeriert und das digerierte Plasmid wurde durch Gel gereinigt. Die durch Hind III digerierte pZS97-DNA wurde mit dem durch Hind III digerierten und gelisolierten chimären Genfragmenten gemischt, ligiert, wie oben transformiert und es wurden Kolonien

auf Ampicillin ausgewählt.

[0230] Binäre Vektoren, die die chimären Gene enthielten, wurden durch triparentale Kopplungen [Ruvkin et al., (1981) Nature 289:85-88] auf den Agrobacterium-Stamm LBA4404/pAL4404 [Hockema et al., (1983), Nature 303:179-180] übertragen, der auf Carbenicillin Widerstandsfähigkeit hin ausgewählt wurde.

[0231] Kulturen von Agrobacterium, die den binären Vektor enthielten, wurden zum Umwandeln von Tabakblattscheiben [Horsch et al. (1985) Science 227:1229-1231] verwendet. Transgene Pflanzen wurden in selektivem Medium, das Kanamycin enthielt, regeneriert.

[0232] Tranformierte Tabakpflanzen, die das chimäre Gen β-Conglycininpromotor/SSP3-5/Phaseolin 3'-Region enthalten, wurden so erhalten. Zwei transformierte Linien, pSK44-3A und pSK44-9A, die eine einzige Stelleninsertion des SSP3-5-Gens trugen, wurden auf der Basis der 3:1-Segregation des Markergens für Kanamycinwiderstandsfähigkeit identifiziert. Die Abkömmlinge der primären Transformanten, die für das Transgen pSK44-3A-6 und pSK44-9A-5 homozygot waren, wurden auf der Basis der 4:0-Segregation der Kanamycinwiderstandsfähigkeit in Samen dieser Pflanzen identifiziert.

[0233] Auf ähnliche Weise wurden transformierte Tabakpflanzen mit den chimären Genen Phaseolin 5'-Region/cts/lysC-M4/Phaseolin 3'-Region und Phaseolin 5'-Region/cts/ecodapA/Phaseolin 3'-Region erhalten. Eine transformierte Linie, BT570-45A, die eine einzige Stelleninsertion der DHDPS- und AK-Gene trug, wurde aufgrund der 3:1-Segregation des Markergens für Kanamycinwiderstandsfähigkeit identifiziert. Abkömmlinge des primären Transformanten, die für das Transgen BT570-45A-3 und Bt570-45A-4 homozygot waren, wurden dann auf der Basis der 4:0-Segregation der Kanamycinwiderstandsfähigkeit in Samen dieser Pflanzen identifiziert.

[0234] Um Pflanzen, die alle drei chimären Gene tragen, zu bilden, wurden genetische Kreuzungen unter Anwendung der homozygoten Stammpflanzen durchgeführt. Die Pflanzen wurden bis zur Reife unter Gewächshausbedingungen gezüchtet. Es wurden Blüten, die als männlich und weiblich verwendet werden sollten, einen Tag vor Öffnen ausgewählt und ältere Blüten am Blütenstand entfernt. Für die Kreuzung wurden weibliche Blüten zum Zeitpunkt kurz vor dem Öffnen gewählt, als die Staubbeutel noch nicht dehiszent waren. Die Blumenkrone wurde auf einer Seite geöffnet und die Staubbeutel entfernt. Männliche Blüten wurden als Blüten gewählt, die sich am gleichen Tag geöffnet hatten und dehiszente Staubbeutel aufwiesen, die reife Pollen abwarfen. Die Staubbeutel wurden entfernt und zum Bestäuben der Stempel der der Staubbeutel beraubten weiblichen Blüten verwendet. Die Stempel wurden zum Verhindern weiterer Bestäubung mit Kunststoffröhren bedeckt. Man ließ die Samenhülsen sich entwickeln und 4-6 Wochen lang trocknen und sie wurden dann geerntet. Zwei der drei einzelnen Hülsen wurden aus jeder Kreuzung ie folgenden Kreuzungen wurden durchgeführt.

männlich	X	weiblich
BT570-45A-3		pSK44-3A-6
BT570-45A-4		pSK44-3A-6
pSK44-3A-6		BT570-45A-4
BT570-45A-5		pSK44-9A-5
pSk44-9A-5		BT570-45A-5

[0235] Getrocknete Samenhülsen wurden aufgebrochen und die Samen eingesammelt und von jeder Kreuzung gepoolt. Dreißig Samen wurden für jede Kreuzung ausgezählt, als Kontrollen wurden Samen aus selbstbefruchteten Blüten jeder Stammpflanze verwendet. Duplikatsamenproben wurden hydrolysiert und auf den gesamten Aminosäuregehalt hin, wie in Beispiel 5 beschrieben, untersucht. Die mengenmäßige Erhöhung des Lysins als Prozentsatz der gesamten Samenaminosäuren im Vergleich mit Samen vom Wildtyp, die 2,56% Lysin enthalten, ist in Tabelle 7 zusammen mit der Kopiezahl jedes Gens im Endosperm des Samens aufgeführt.

TABELLE 7

männlich	X weiblich	Endosperm Kopiezahl AK- & DHDPS-Gene	Endosperm Kopiezahl SSP-Gen	Lysin- Erhöhung
BT570-45A	X BT570-45A	1,5*	0	0
pSK44-9A	X pSK44-9A	0	1,5*	0,12
pSK44-9A-5	X pSK44-9A-5	0	3,0	0,29
pSK44-9A-5	X BT570-45A-5	2	1	0,6
BT570-45A-5	X pSK44-9A-5	1	2	0,29
pSK44-3A	X pSK44-3A	0	1,5*	0,28
pSK44-3A-6	X pSK44-3A-6	0	3,0	0,5
pSK44-3A-6	X BT570-45A-4	2	1	0,62
BT570-45A-3	X pSK44-3A-6	1	2	0,27
BT570-45A-4	X pSK44-3A-6	1	2	0,29

* Die Kopiezahl ist der Durchschnitt der Samenpopulation

[0236] Die Ergebnisse dieser Kreuzungen zeigen, dass die gesamten Lysinniveaus in Samen durch die Koordinatexpression der Lysinbiosynthesegene und des Proteins SSP3-5 von hohem Lysingehalt um 10-25 Prozent erhöht werden können. Bei Samen, die aus Hybridpflanzen deriviert sind, ist dieser Synergismus am stärksten, wenn die Biosynthesegene von der weiblichen Stammpflanze deriviert sind, möglicherweise aufgrund der Gendosierung im Endosperm. Es ist zu erwarten, dass das Lysinniveau noch weiter steigen würde, wenn die Biosynthesegene und lysinreichen Proteingene alle homozygot wären.

BEISPIEL 11

SOJABOHNENPFLANZEN, DIE DIE CHIMÄREN GENE PHASEOLINPROMTOR/CTS/CORDAPA UND PHASEOLINPROMTOR/SSP3-5 ENTHALTEN

[0237] Transformierte Sojabohnenpflanzen, die das chimäre Gen Phaseolinpromotor/cts/cordapA/Phaseolin 3'-Region exprimieren, sind in Beispiel 6 beschrieben worden. Transformierte Sojabohnenpflanzen, die das chimäre Gen Phaseolinpromotor/SSP3-5/Phaseolin 3'-Region exprimiert wurden durch Insertieren des chimären Gens als isoliertes Hind III-Fragment in ein äquivalentes Sojabohnentransformationsvektorplasmid pML63 (**Fig. 14**, Beispiel 6) und Durchführen der Transformation, wie in Beispiel 6 beschrieben, erhalten.

[0238] Es wurden aus Samen aus primären Transformanten Proben genommen durch Schneiden kleiner Stückchen von den Seiten der Samen und von der Embryonenachse hinweg. Die Stückchen wurden auf GUS-Aktivität, wie in Beispiel 6 beschrieben, untersucht, um zu bestimmen, welche der segregierten Samen die Transgene trugen. Die Hälfte der Samen wurde zu Mehl gemahlen und auf die Expression des SSP3-5-Proteins hin durch enzymverbundenen Immunosorbensassay (ELISA) untersucht. Der Elisa wurde wie folgt durchgeführt:
Es wurde in Fusionsprotein von Glutathion-S-Transferase und dem SSP3-5-Genprodukt durch Verwendung des Pharmacia™ pGEX GST-Genfusionssystems (Cunent Protocols in Molecular Biology – Gegenwärtige Protokolle in der molekularen Biologie) Band 2, Seite 16.7.1-8 (1989) John Wiley and Sons) gebildet. Das Fusionsprotein wurde durch Affinitätschromatographie auf Glutathionagarose-(Sigma) oder Glutathionsepharose (Pharmacia) Perlen gereinigt, unter Anwendung von Centricon 10™ – (Amicon) Filtern konzentriert und dann einer SDS-Polyacrylamidelektrophorese (15% Acrylamid, 19:1 Acrylamid:Bisacrylamid) zur weiteren Reinigung unterworfen. Das Gel wurde 30 min lang mit Coomassie-Blau gefärbt, in 50% Methanol, 10% Essigsäure entfärbt und die Proteinbanden unter Anwendung eines Amicon™-Centiluter-Mikroelektroeluierers (Paul T. Matsudaira, Verfasser, A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing (Ein praktischer Führer für die Protein- und Peptidreinigung für das Mikrosequenzieren) Acadmic Press Inc. New York, 1989) elektroeluiert. Ein zweites Gel, das auf die gleiche Weise zubereitet und einem Arbeitsgang unterworfen worden war, wurde in einer Nichtessigsäure gefärbt, die Färbemittel [9 Teile 0,1 % Coomassie-Blau G250

(Bio-Rad) in 50% Methanol und 1 Teil Serva Blue (Serva, Westbury, NY) in destilliertem Wasser enthielt, 1-2 h lang gefärbt. Das Gel wurde kurz in 20% Methanol, 3% Glycerin für 0,5-1 h entfärbt, bis die GTS-SSP3-5-Bande gerade noch sichtbar war. Diese Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem elektroeluierten Material an Hazelton Laboratories zur Verwendung als Antigen beim Immunisieren eines Neuseelandkaninchens geschickt. Insgesamt 1 mg des Antigens wurde verwendet (0,8 mg in Gel, 0,2 mg in Lösung). Alle drei Wochen wurden von Hazelton Laboratories Testblutproben bereitgestellt. Der ungefähre Titer wurde durch Western-Blotting von E. coli-Extrakten aus Zellen, die das SSp3-5-Gen enthielten, unter der Kontrolle des T7-Promotors in verschiedenen Verdünnungen von Protein und Serum getestet.

[0239] IgG wurde von dem Serum unter Anwendung einer Protein A-Sepharosesäule isoliert. Das IgG wurde auf Mikrotiterplatten in einer Menge von 5 µg pro Vertiefung schichtweise eingebracht. Eine getrennte Portion des IgG wurde biotinyliert.

[0240] Wässrige Extrakte aus den transgenen Pflanzen wurden verdünnt und in die Vertiefungen eingegeben, wobei gewöhnlich mit der Probe, die 1 µg des gesamten Proteins enthielt, begonnen wurde. Die Probe wurde mehrere Male verdünnt, um sicherzustellen, dass mindestens eine der Verdünnungen ein Ergebnis erbrachte, das innerhalb der Reichweite einer Standardkurve lag, die auf der gleichen Platte gebildet wurde. Die Standardkurve wurde unter Anwendung von chemisch synthetisiertem SSP3-5-Protein gebildet. Die Proben wurden eine Stunde lang bei 37 ° inkubiert und die Platten wurden gewaschen. Das biotinylierte IgG wurde dann in die Vertiefungen eingegeben. Die Platten wurden 1 h bei 37 ° inkubiert und gewaschen. An Streptavidin konjugierte alkalische Phosphatase wurde in die Vertiefungen eingegeben, 1 h bei 37 ° inkubiert und gewaschen. Ein Substrat, das aus 1 mg/ml p-Nitrophenylphosphat in 1M Diethanolamin bestand, wurde in die Vertiefungen hineingegeben und die Platten wurden 1 h bei 37 °C inkubiert. Eine 5%-ige EDTA-Stopplösung wurde in die Vertiefungen eingegeben und die Extinktion bei 405 nm minus 650 nm abgelesen. Die transgenen Sojabohnensamen enthielten 0,5 bis 2,0% durch Wasser extrahierbares Protein als SSP3-5.

[0241] Die verbleibende Hälfte Samen, die bezüglich GUS und SSP3-5-Protein positiv waren. wurden ausgepflanzt und bis zur Reife unter Gewächshausbedingungen gezüchtet. Um Homozygoten für den GUS-Phänotyp zu bestimmen, wurden Samen aus diesen R1-Pflanzen auf Segregierung von GUS-Aktivität, wie oben, gescreened. Pflanzen die für das Phaseolin/SSP3-5-Gen homozygot waren, wurden mit homozygoten transgenen Sojabohnen gekreuzt, die das Corynbacterium dapA-Genprodukt exprimieren.

[0242] Als bevorzugte Alternative zum Zusammenbringen des chimären SSP-Gens und von chimärem cordapA-Gen A durch genetisches Kreuzen wurde ein einziger Sojabohnentransformationsvektor, der beide Gene trägt, konstruiert. Das Plasmid pML63, das das oben beschriebene chimäre Gen Phaseolinpromotor/SSP3-5/Phaseolin 3'-Region trägt, wurde mit dem Restriktionsenzym BamH I gespalten und das BamH I-Fragment, das das chimäre Gen Phaseolinpromotor/cts/cordapA/Phaseolin 3'-Region (Beispiel 5) trägt, wurde insertiert. Dieser Vektor kann in Sojabohnen, wie in Beispiel 6 beschrieben, transformiert werden.

BEISPIEL 12

KONSTRUKTION CHIMÄRER GENE FÜR DAS EXPRIMIEREN VON CORYNEBACTERIUM DHDPS UND SSP3-5 IM EMBRYO UND ENDOSPERM VON TRANSFORMIERTEM MAIS

[0243] Die folgenden chimären Gene wurden zur Transformation in Mais
Globulin 1 Promotor/mcts/cordapA/NOS 3'-Region
Glutelin 2 Promotor/mcts/cordapA/NOS 3'-Region
Globulin 1 Promotor/SSP3-5/Gluobulin 13'-Region
Glutelin 2 Promotor/SSP3-5/10 kD 3'-Region

hergestellt.

[0244] Der Glutelin 2-Promotor wurde aus genomischer Mais-DNA unter Anwendung der PKR mit Primern auf der Basis der veröffentlichten Sequenz [Reina et al. (1990) Nukleic Acids Res. 18:6426-6426] kloniert. Das Promotorfragment enthält 1020 Nukleotide stromaufwärts vom ATG-Translationsstartcodon. Durch PKR wurde eine Nco I-Stelle an der ATG-Startstelle eingeführt, um direkte Translationsfusionen zu gestatten. Eine BamH 1-Stelle wurde am 5'-Ende des Promotors eingeführt. Das 1,02 kb BamH I bis Nco I-Promotorfragment wurde in die BambH I bis Nco I-Stellen des Pflanzenexpressionsvektors pML63 (vergleiche Beispiel 11) unter Ersetzen des 35S-Promotors zur Bildung des Vektors pML90 kloniert. Dieser Vektor enthält den Glutelin 2-Promotor der mit der GUS-Kodierregion und NOS 3' verknüpft ist.

[0245] Die 10 kD Zein 3'-Region wurde aus einem Zeingenklon von 10 kD deriviert, der durch PKR aus genomischer DNA unter Anwendung von Oligonukleotidprimern auf der Basis der veröffentlichten Sequenz [Kirihara et al. (1988) Gene 71:359-370] gebildet wurde. Die 3'-Region erstreckt sich über 940 Nukleotide vom Stopcodon. Restriktionsendonukleasestellen für Kpn I-, Sma I- und Xba I-Stellen wurden sofort auf den TAG-Stopcodon hin durch Oligonukleotidinsertion zum Erleichtern des Klonierens zugegeben. Ein Sma I- bis Hind III-Segment, das die 10 kD 3'-Region enthält, wurde isoliert und in Sma I und Hind III, die durch pML90 digeriert worden waren, unter Ersetzen der NOS 3'-Sequenz durch die 10 kd 3'-Region ligiert unter Bildung des Plasmids pML103. pML103 enthält den Glutelin 2-Promotor, eine Nco I-Stelle am ATG-Startcodon des GUS-Gens, Sma I- und Xba I-Stellen nach dem Stopcodon und 940 Nukleotide der Zein 3'-Sequenz von 10 kD.

[0246] Die Globulin 1-Promotor- und 3'-Sequenzen wurden von einer genomischen Clontech Mais-DNA-Bibliothek unter Anwendung von Oligonukleotidsonden auf der Basis der veröffentlichten Sequenz des Globulin 1-Gens [Kriz et al. (1989) Plant Physiol. 91:636] isoliert. Das klonierte Segment umfasst das Promotorfragment, das sich über 1078 Nukleotide stromaufwärts vom ATG Translationsstartcodon erstreckt, die gesamte Globulinkodiersequenz einschließlich Introne und die 3'-Sequenz, die sich über 803 Basen vom Translationsstop erstreckt, umfasst. Um das Ersetzen der Globulin I-Kodiersequenz durch andere Kodiersequenzen zu erlauben, wurde eine Nco I-Stelle am ATG Startcodon eingeführt und kPN I- und Xba I-Stellen wurden auf den Translationsstopcodon hin durch PKR zum Bilden des Vektors pCC50 eingeführt. Es besteht auch eine zureite Nco I-Stelle innerhalb des Globulin 1-Promotorfragments. Die Globulin 1-Genkasette ist durch Hind III-Stellen flankiert.

[0247] Die biosynthetischen pflanzlichen Aminosäureenzyme sind dafür bekannt, dass sie sich in den Chloroplasten befinden und aus diesem Grund werden sie mit einem Chloroplasttargetingsignal synthetisiert. Bakterienproteine wie DHDPS besitzen kein derartiges Signal. Eine Chloroplastübergangssequenz (cts) wurde aus diesem Grund an die cordapA-Kodiersequenz in den unten beschriebenen chimären Genen fusioniert. Für Mais basierte die verwendete cts auf der cts der kleinen Untereinheit von Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase aus Mais [Lebrun et al. (1987) Nukleic Acids Res. 15:4360] und ist so mit acts bezeichnet, um sie von der Sojabohnen-cts zu unterscheiden. Die Oligonukleotide SEQ ID NO:93-98 wurden synthetisiert und im Wesentlichen wie in Beispiel 4 beschrieben verwendet.

[0248] Die Oligonukleotide SEQ ID NO:93 und SEQ ID NO:94, die den Carboxyterminalteil des Maischloroplasttargetingsignals kodieren, wurden einem Annealing unterzogen, was zu mit Xba I und Nco I verträglichen Enden führt, durch Polyacrylamidgelelektrophorese gereinigt und in durch Xba I plus Co I digerierte pBT492 insertiert (vergleiche Beispiel 3). Die Insertion der richtigen Sequenz wurde durch DNA-Sequenzieren unter Bildung von pBT556 nachgeprüft. Die Oligonukleotide SEQ ID NO:95 und SEQ ID NO:96, die den mittleren Teil des Chloroplasttargetingsignals kodieren, wurden einem Annealing unterzogen, was zu mit Bgl II und Xba I verträglichen Enden führt, durch Polyacrylamidgelelektrophorese gereinigt und in durch Bgl II und Xba I digerierte pBT556 insertiert. Die Insertion der richtigen Sequenz wurde durch DNA-Sequezieren unter Bildung von pBT557 nachgeprüft. Die Oligonukleotide SEQ ID NO:97 und SEQ ID NO:98, die den Aminoterminalteil des Chloroplasttargetingsignals kodieren, wurden einem Annealing unterzogen, was zu mit Nco I und Afl II verträglichen Enden führt, durch Polyacrylamidgelelektrophorese gereinigt und in durch Nco I und Afl II pBT557 insertiert. Die Insertion der richtigen Sequenz wurde durch DNA-Sequenzieren unter Bildung von pBT558 nachgeprüft. So wurde die mcts an das lysC-M4-Gen fusioniert.

[0249] Ein DNA-Fragment, das die gesamte mcts enthielt, wurde unter Anwendung von PKR zubereitet. Die Matrizen-DNA bestand aus pBT558 und die verwendeten Oligonukleotidprimer waren:
SEQ ID NO:99:
GCGCCCACCG TGATGA
SEQ ID NO:100:
CACCGGATTC TTCCGC

[0250] Das mcts-Fragment wurde an den Aminoterminus des DHDPS-Proteins, das durch das ecodapA-Gen kodiert ist, durch Digerieren mit Nco I und Behandeln mit dem Klenow-Fragment von DNA-Polymerase zum Füllen der 5'-Überhänge verknüpft. Das insertierte Fragment und die Vektor-Insertionsverbindungen wurden durch DNA-Sequenzieren, das pBT576 ergab, als richtig bestimmt.

[0251] Um das chimäre Gen: Globulin 1-Promotor/mcts/cordapA/NOS 3'-Region zu konstruieren, wurde ein Nco I bis Kpn I-Fragment, das die mcts-ecodapA-Kodiersequenz enthielt, vom Plasmid pBT576 (vergleiche Beispiel 6) isoliert und in durch Nco I plus Kpn I digerierte pCC50 unter Bildung des Plasmids pBT662 insertiert. Dann wurde die ecodapA-Kodiersequenz durch die cordapA-Kodiersequenz wie folgt ersetzt. Ein Afl II bis Kpn

I-Fragment, das die distalen zwei Drittel der an die cordapA-Kodiersequenz fusionierten mcts enthielt, wurde in durch Afl II bis Kpn I digerierte pBT662 unter Bildung des Plasmids pBT677 insertiert.

[0252] Um das chimäre Gen: Glutelin 2-Promotor/mcts/cordapA/NOS 3'-Region zu konstruieren, wurde ein Nco I bis Kpn I-Fragment, das die mcts-cordapA-Kodiersequenz enthielt, vom Plasmid pBT677 isoliert und in durch Nco I bis Kpn I digerierte pML90 unter Bildung des Plasmids pBT679 insertiert.

[0253] Um das chimäre Gen Glutelin 2-Promotor/SSP3-5/10 kD 3'-Region zu konstruieren, wurde das Plasmid pML 103 (oben), das den Glutelin 2-Promotor und die 10 kD Zein 3'-Region enthielt, an den Nco I- und Sma I-Stellen gespalten. Die SSP3-5-Kodienegion (Beispiel 9) wurde als Fragment von Nco I zum stumpfen Ende durch Spalten mit Xba I gefolgt vom Füllen des klebrigen Endes unter Anwendung von Klenow-Fragment von DNA-Polymerase und darauffolgendes Spalten mit Nco I isoliert. Das Fragment des 193 Basenpaars Nco I bis zum stumpfen Ende wurde in das durch Nco I und Sma I geschnittene pML103 unter Bildung von pLH104 ligiert.

[0254] Um das chimäre Gen: Globulin 1-Protomor/SSP3-5/Globulin 1 3'-Region zu konstruieren, wurde das Fragment des 193 Basenpaars Nco I und Xba I, das die SSP3-5-Kodierregion (Beispiel 9) enthält, in das Plasmid pCC50 (oben), das vollständig mit Xba I gespalten worden war, insertiert und dann teilweise mit Nco I zum Öffnen des Plasmids am ATG-Startcodon unter Bildung von pLH105 geschnitten.

BEISPIEL 13

MAISPFLANZEN, DIE CHIMÄRE GENE ENTHALTEN, ZUM EXPRIMIEREN VON CORYNEBACTERIUM DHDPS IM EMBRYO UND ENDOSPERM

[0255] Mais wurde mit den chimären Genen: Globulin 1-Promotor/mcts/cordapA/NOS 3'-Region oder Glutelin 2 Promotor/mcts/cordapA/NOS 3'-Region transformiert.

[0256] Entweder ein oder beide Plasmidvektoren, die auswählbare Marker enthalten, wurden bei den Transformationen verwendet. Ein Plasmid, pDETRIC, enthielt das bar-Gen von Steptomyces hygroscopicus, das eine Resistenz gegen das Herbizid Glufosinat [Thompson et al. (1987) The EMBO Journal 6:2519-2523] verleiht. In dem bakteriellen Gen wurde der Translationscodon von GTG zu ATG zur richtigen Translationsinitiation in Pflanzen geändert [De Block et al. (1987) The EMBO Journal 6:2513-2518]. Das bar-Gen wurde durch den 35S-Promotor aus Blumenkohlmosaikvirus getrieben und macht sich das Terminations- und Polyadenylationssignal des Octopinsynthasegens aus Agrobacterium tumefaciens zunutze. Als Alternative bestand der auswählbare Marker aus 35S/Ac einem synthetischen Phosphinothricin-N-acetyltransferase-(pat)-Gen unter der Kontrolle des 35S-Promotors und des 3-Terminator-Polyadenylationssignals aus Blumenkohlmosaikvirus [Eckes et al., (1989) J. Cell Biochem. Suppl. 13 D].

[0257] Die embryogenen Calluskulturen wurden aus unreifen Embryos (ca. 1,0 bis 1,5 mm) initiiert, die aus Körnern einer Maislinie geschnitten worden waren, die zu Ergeben einer „Callus Typ II"-Gewebenkulturreaktion gezüchtet worden war. Die Embryos wurden 10 bis 12 Tage nach der Bestäubung zerschnitten und mit der Achsenseite nach unten in Kontakt mit durch Agarose verfestigtes N6-Medium [Chu et al. (1974) Sci Sin 18:659-668] eingegeben, das mit 0,5 mg/l 2,4-D (N6-0,5) ergänzt worden war. Die Embryos wurden bei 27 °C im Dunkeln gehalten. Krümeliger embryogener Callus, der aus undifferenzierten Massen von Zellen bestand, wobei somatische Proembryos und somatische Embryos an Suspensorstrukturen getragen wurden, proliferierten aus dem Scutellum der unreifen Embryos. Klonale embryogene Calli, die aus einzelnen Embryos isoliert worden waren, wurden identifiziert und auf N6-0,5-Medium alle 2 bis 3 Wochen subkultiviert.

[0258] Die Teilchenbombadiermethode wurde zum Übertragen von Genen auf die Calluskulturzeilen verwendet. Ein Biolistic PDS-1000/He (BioRAD Laboratories, Hercules, CA) wurde für diese Versuche verwendet.

[0259] Zirkuläre Plasmid-DNA oder DNA, die durch Restriktionsendonukleasedigestion linearisiert worden war, wurde auf der Oberfläche von Goldteilchen ausgefällt. DNA aus zurei oder drei verschiedenen Plasmiden, wobei eines den auswählbaren Marker für die Maistransformation und eines oder beide die chimären Gene zum Verstärken der Lysinansammlung in Samen enthielten, wurden gleichzeitig ausgefällt. Um dies zu erreichen, wurden 1,5 µg jeder DNA (in Wasser in einer Konzentration von ca. 1 mg/ml) 25 ml Goldteilchen (Durchschnittsdurchmesser 1,5 µm) zugegeben und in Wasser (60 mg Gold pro ml) suspendiert. Calciumchlorid (25 ml einer 2,5 M Lösung) und Spermidin (10 ml einer 1,0 M Lösung) wurden der Gold-DNA-Suspension zugegeben, während die Röhre in einer Wirbelvorrichtung behandelt wurde. Die Goldteilchen wurden in einer Mikro-

fuge 10 sec lang zentrifugiert und die überstehende Substanz wurde entfernt. Die Goldteilchen wurden dann erneut in 200 ml absolutem Ethanol suspendiert, nochmals zentrifugiert und die überstehende Substanz entfernt. Schließlich wurden die Goldteilchen nochmals in 25 ml absolutem Ethanol suspendiert und zureimal eine sec lang beschallt. Fünf µl der mit DNA beschichteten Goldteilchen wurden dann auf eine Makroträgerscheibe aufgeladen und man ließ das Ethanol verdampfen unter Zurücklassen der mit DNA bedeckten Goldteilchen, die auf die Scheibe aufgetrocknet waren.

[0260] Embryogener Callus (von der #LH132.5.S genannten Calluslinie) wurde in einem runden Bereich von ca. 6 cm Durchmesser im Mittelpunkt einer Petrischale von 100 × 20 mm angeordnet, die N6-0,5-Medium enthielt, das mit 0,25 M Sorbit und 0,25 M Mannit ergänzt worden war. Das Gewebe wurde 2 h lang auf dieses Medium vor der Bombardierung als Vorbehandlung aufgebracht und verblieb auf dem Medium während des Bombardierungsvorgangs. Am Ende der Vorbehandlungsperiode von 2 h wurde die Petrischale, die das Gewebe enthielt, in die Kammer des PDS-1000/He eingegeben. Die Luft in der Kammer wurde dann bis zu einem Vakuum von 28 Zoll Hg evakuiert. Der Makroträger wurde mit einer Heliumschockwelle unter Anwendung einer Brechmembran, die zerbricht, wenn der He-Druck in der Schockröhre 1100 psi erreicht, beschleunigt. Das Gewebe wurde 8 cm vom Stoppschirm entfernt, positioniert. Vier Plattengewebe wurden mit den mit DNA beschichteten Goldteilchen bombardiert. Sofort auf das Bombardieren hin wurde das Callusgewebe auf N6-0,5-Medium ohne ergänzendes Sorbit oder Mannit übertragen.

[0261] Innerhalb von 24 h nach dem Bombardieren wurde das Gewebe auf selektives Medium, N6-0,5-Medium, übetragen, das 2 mg/l Glufosinat enthielt und kein Casein oder Prolin aufwies. Das Gewebe, das auf diesem Medium langsam weiterwuchs, wurde auf frisches N6-0,5-Medium übetragen, das alle zurei Wochen mit Glufosinat ergänzt wurde. Nach 6-12 Wochen wurden Klone von aktiv wachsendem Callus identifiziert. Der Callus wurde dann auf Medium übertragen, das die Pflanzenregenerierung fördert.

[0262] Aus transformiertem Callus regenerierte Pflanzen wurden auf das Vorliegen der intakten Transgene durch Southern Blot oder PKR analysiert. Die Pflanzen wurden selbstbefruchtet oder auf eine Elitlinie ausgekreuzt, um R1- bzur. F1-Samen zu bilden. Einzelne R1-Samen oder sechs bis acht F1-Samen wurden gepoolt und zur Expression des Corynebacterium DHDPS Proteins durch Western Blot-Analyse untersucht. Die freie Aminosäurezusammensetzung und die gesamte Aminosäureszusammensetzung der Samen wurde, wie in früheren Beispielen beschrieben, bestimmt.

[0263] Die Expression des Corynebacterium DHDPS-Proteins, das entweder durch den Globulin- oder den Glutelin-Promotor getrieben wird, wurde in den Maissamen beobachtet (Tabelle 8). Die freien Lysinniveaus in den Samen stiegen von ca. 1,4% freier Aminosäure in Kontrollsamen auf 15-27% in Samen auf, die Corynebacterium DHDPS aus dem Globulin I-Promotor exprimieren. Die höhere DHDPS-Expression und das höhere Lysinniveau in den selbsbefruchteten Samen rührt wahrscheinlich von der Tatsache her, dass zu erwarten ist, dass der Hälfte der gepoolten Samen in den ausgekreuzten Linien das Transgen aufgrund von Segregation fehlt. Eine geringer Erhöhung des freien Lysins wurde in Samen beobachtet, die Corynebacterium DHDPS aus dem Glutelin 2-Promotor exprimieren. So ist es zum Erhöhen des Lysins eventuell besser, dieses Enzym im Embryo anstatt dem Endosperm zu exprimieren. Ein hohes Niveaus an Saccharopin, das auf Lysinkatabolismus hinweist, wurde in Samen beobachtet, die hohe Niveaus an Lysin enthielten.

[0264] Normalerweise stellt Lysin ca. 2,3% des Aminosäuregehalts der Samen dar. Es ist deshalb aus der Tabelle 8 offensichtlich, dass wesentliche Erhöhungen (35%-130%) an Lysin als Prozentsatz der gesamten Samenaminosäuren in Samen aufgefunden worden sind, die Corynebacterium DHDPS aus dem Globulin I-Promotor exprimieren.

TABELLE 8

1088.1.3 Linie: Globulin 1 Promotor/mcts/cordapA/NOS 3-Region

1099.2.1 Linie: Globulin 1 Promotor/mcts/cordapA/NOS 3-Region

1090.2.1 Linie: Glutelin 2 Promotor/mcts/cordapA/NOS 3-Region

Transgene Linie	WESTERN Coryne DHDPS	% Lys freier Samenaminosäuren	% Lys der gesamten Samenaminosäuren
1088.1.2 x élite	+	15	3,1
1099.2.1. auto-	++	27	5,3
fécond1090.2.1 x élite	+	2,3	1,7

BEISPIEL 14

TRANSFORMATION VON SOJABOHNEN MIT DEM CHIMÄREN GEN KUNITYTRYPSININHIBITOR 3-PROMOTOR/CTS/CORDAPA

[0265] Eine samenspezifische Expressionskassette, die aus dem Promotor und dem Transkriptionsterminator aus dem Sojabohnenkunitztrypsininhibitor 3- (KT13-) Gen [Jofuku et al. (1989) Platn Cell 1:427-435] wurde gebildet. Die KT13-Kasette umfasst ca. 2000 Nukleotide stromaufwärts (5') vom Translationsinitiationscodon und ca. 200 Nukleotide stromabwärts (3') vom Translationsstopcodon des Kunitztrypsininhibitors 3. Zwischen den 5'- und 3'-Regionen wurden die Restriktionsendonukleasestellen Nco I (die den ATG-Translationsinitiationscodon umfasst) und Kpn I gebildet, um die Insertion des Corynebacterium dapA-Gens zu gestatten. Die gesamte Kassette wurde durch BamH I- und Sal I-Stellen flankiert.

[0266] Wie in Beispiel 4 beschrieben, wurde eine Chloroplasmansitsequenz (cts) an die dapA-Kodiersequenz in dem chimären Gen fusioniert. Die verwendete cts basierte auf der cts der kleinen Untereinheit von Ribulose-1,5-biphosphatcarboxylase aus Sojabohnen [Berry-Lowe et al. (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:483-498]. Ein Nco I-Kpn I-Fragment von 1030 bp, das die cts enthielt, die an der cordapA-Kodierregion angeknüpft war, wurde aus einem Agarosegel auf die Elektrophorese hin isoliert und in die KT13-Expressionskasette unter Bildung des Plasmids pML102 (**Fig. 15**) insertiert.

[0267] Das Plasmid pML102 wurde in Sojabohnen durch teilchenvermittelte Bombardierung durch die Firma Agracetus (Middleton, WI) dem im Patent der Vereinigten Staaten Nr. 5015580 vorgeschriebenen Verfahren entsprechend eingeführt. Zum Screenen auf transformierte Zellen wurde das Plasmid pML102 gleichzeitig mit einem anderen Plasmid bombardiert, das ein Sojabohnentransformationsmarkergen trägt, das aus dem 35S-Promotor aus Blumenkohlmosaikvirus besteht, das die Expression des E. coli-β-Glucuronidase- (GUS-) Gens [Jefferson et al., (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8447-8451] trägt, mit der Nos 3'-Region treibt.

[0268] Es war zu erwarten, dass die Transgene sich in den R1-Samen der transformierten Pflanzen absondern würden. Um Samen zu identifizieren, die das Transformationsmarkergen trugen, wurde ein kleines Stück des Samens mit einer Rasierklinge abgeschnitten und in eine Vertiefung in einer wegwerfbaren Mikrotiterplatte aus Kunststoff eingegeben. Eine GUS-Assaymischung bestehend aus 100 mm NaH_2PO_4, 10 mM EDTA, 0,5 mM $K_4Fe(CN)_6$, 0,1% Triton X-100, 0,5 mg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-glucuronsäure wurde zubereitet und 0,15 ml wurden in jede Mikrotitervertiefung eingegeben. Die Mikrotiterplatte wurde 45 Minuten bei 37 ° inkubiert. Die Entwicklung einer blauen Farbe zeigt die Expression von GUS in dem Samen an.

[0269] Zum Messen der gesamten Aminosäurezusammensetzung reifer Samen wurden 1-1,4 Milligramm des Samenmehls in 6N-Salzsäure, 0,4% β-Mercaptoethanol unter Stickstoff 24 h bei 110-120 °C hydrolysiert; 1/50 der Probe wurde auf einem Aminosäureanalysator von Beckman, Modell 6300, unter Anwendung der Postsäulenninhydrinerfassung einem Arbeitslauf unterzogen. Die Lysin- (und anderen Aminosäure-) Niveaus in den Samen wurden als Prozentsatz der gesamten Aminosäuren verglichen. Sojabohnensamen vom Wiltyp enthalten 5,7-6,0% Lysin.

[0270] Einhundertundfünfzig einzelne Samen aus sechzehn unabhängigen transformierten Linien wurden analysiert (Tabelle 9). Zehn der sechzehn Linien wiesen Samen mit einem Lysingehalt von 7% der gesamten Samenaminosäuren oder mehr auf, was eine 16-22%-ige Erhöhung im Vergleich mit Samen vom Wildtyp dar-

stellt. So wurden bei mehr als 62% der Transformationsereignisse das das cordapA-Gen tragende Plasmid zusammen mit dem das Plasmid tragenden Marker-GUS-Gen integriert. Ca. 80% der Samen mit hohem Lysingehalt waren GUS-positiv, was darauf hinweist, dass das Plasmid, das das cordapA-Gen trägt, gewöhnlich an der gleichen Chromosomenstelle integriert wird, wie das Plasmid, das das GUS-Gen trägt. Jedoch bestand bei einigen transformierten Linien, z.B. 260-05, kaum eine Korrelation zurischen den GUS-positiven Phänotypen und den Phänotypen von hohem Lysingehalt, was darauf hinweist, dass die beiden Plasmide an unverknüpften Stellen integriert wurden. Beide dieser Typen von Transformationsereignissen waren aufgrund des für die Transformation angewendeten Vorgangs zu erwarten.

[0271] Es wurden Samen mit einem Lysingehalt von mehr als 20% der gesamten Samenaminosäuren erhalten. Dies stellt eine fast dreihundert prozentige Erhöhung des Samenlysingehalts dar.

TABELLE 9

LINIE #	SAMEN #	GUS	% LYS
257-1	G1	+	8,30
	G2	+	7,99
	G3	+	11,51
	G4	+	8,52
	G33	+	7,68
	G34	+	9,93
	G35	-	5,97
	G36	-	5,71
	G37	+	7,48
	G38	+	9,42
	G39	+	10,44
	G40	+	8,63

LINIE #	SAMEN #	GUS	% LYS
	G41	+	9,42
	G42	+	8,53
	G43	+	10,54
	G44	-	5,83
	G45	+	7,15
	G46	+	7,85
	G47	+	7,34
257-21	G21	+	12,90
	G22	+	11,52
	G23	+	9,34
	G24	-	5,82
	G25	-	5,61
	G26	-	5,70
	G27	-	5,84
	G28	-	14,27
	G48	+	15,23
	G49	+	18,79
	G50	+	13,82
	G51	-	5,94
	G52	+	13,29
	G53	+	14,61
257-41	G54	+	6,28
	G55	+	6,27
	G56	+	6,32
	G57	+	6,4
	G180	+	5,75
	G181	+	7,42
257-46	G60	+	6,76
	G61	+	6,73
	G62	-	6,18
	G63	+	6,13
	G182	+	6,83
	G183	+	6,23
257-49	G78	-	6,40
	G79	+	6,46
	G184	+	6,37
	G185	+	6,15
	G186	+	6,41

LINIE #	SAMEN #	GUS	% LYS
	G187	+	7,90
257-50	G88	-	6,15
	G89	-	6,12
	G188	+	6,19
	G189	+	6,07
	G190	+	6,09
	G191	+	6,30
257-51	G228	-	5,81
	G229	-	5,74
	G230	-	5,59
	G231	-	6,00
	G232	-	5,89
	G233	+	21,49
	G234	+	20,30
	G235	+	11,89
	G236	+	12,40
	G237	+	15,09
	G238	+	12,79
	G239	+	17,19
260-05	G90	-	5,41
	G91	-	7,65
	G95	-	6,39
	G96	-	5,80
	G97	-	6,12
	G98	-	5,90
	G99	-	6,17
	G160	-	8,04
	G161	-	12,64
	G162	-	6,91
	G163	-	5,83
	G164	-	8,28
	G165	-	12,52
	G166	-	5,68
	G167	-	9,92
	G168	-	5,89
	G169	-	6,10
	G170	+	6,49
	G171	+	6,10

LINIE #	SAMEN #	GUS	% LYS
	G172	-	12,83
	G173	-	6,55
	G174	-	6,62
	G175	+	13,02
	G176	-	10,13
	G177	-	5,97
	G178	-	11,37
	G179	-	12,63
260-13	G108	+	6,64
	G109	+	7,92
	G192	+	10,29
	G193	+	7,37
	G194	+	6,73
	G195	+	10,35
260-16	G29	+	11,64
	G30	+	14,87
	G31	+	15,02
	G32	-	6,24
260-17	G115	+	11,91
	G116	-	6,21
	G117	-	6,08
	G118	-	6,28
	G119	-	6,30
	G196	+	7,76
260-23	G129	+	5,93
	G197	+	6,04
	G198	+	5,99
	G199	+	6,11
	G200	+	6,35
	G201	+	6,19
260-31	G202	+	6,19
	G203	+	6,19
	G204	+	6,13
	G205	+	6,40
	G206	+	6,73
	G207	+	6,23
260-33	G217	+	6,80
	G218	-	7,00

LINIE #	SAMEN #	GUS	% LYS
	G219	-	6,80
	G220	-	6,10
	G221	-	6,83
	G222	-	6,18
	G223	+	5,92
	G224	+	6,61
	G226	+	6,17
	G227	+	6,43
	G240	+	6,25
	G241	+	6,13
260-44	G148	+	6,51
	G149	+	6,21
	G208	+	6,02
	G209	+	6,17
	G210	+	6,12
	G211	+	6,09
260-46	G158	-	6,00
	G159	+	6,30
	G212	+	6,40
	G213	+	6,50
	G214	+	6,40
	G215	+	6,60

SEQUENZAUFLISTUNG

1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

(I) ANMELDER:

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

(B) STRAßE: 1007 MARKET STREET

(C) ORT: WILMINGTON

(D) STAAT: DELAWARE

(E) LAND: VEREINIGTE STAATEN VON AMERIKA

(F) POSTLEITZAHL: 19898

(F) TELEFON: 302-992-4931

(H) FAX: 302-773-0164

(I) TELEX: 6717325

(II) TITEL DER ERFINDUNG: CHIMÄRE GENE UND VERFAHREN ZUM ERHÖHEN DES LYSINGEHALTS VON MAIS-, SOJABOHNEN- UND RAPSPFLANZEN)

(III) ANZAHL VON SEQUENZ: 100

(IV) COMPUTERLESBARE FORM:

(A) MEDIUMTYP: DISKETTE, 3,5 ZOLL

(B) RECHNER: MACINTOSH

(C) ARBEITSSYSTEM: MACINTOSH 6.0

(D) SOFTWARE: MIKROSOFT WORD 4.0

(V) ZUR ZEIT GÜLTIGE ANMELDUNGSDATEN:

(A) ANMELDUNGSNUMMER:

(B) ANMELDETAG:

(C) KLASSIFIKATION:

(VI) FRÜHERE ANMELDUNGSDATEN:

(A) ANMELDUNGSNUMMER 08/160.117

(B) ANMELDUNGSDATUM: 30. NOVEMBER 1993

(VII) INFORMATIONEN BEZÜGLICH DES ANWALTS:

(A) NAME: BARBARA C. SIEGELL

(B) REGISTRATIONSNUMMER: 30.684

(C) BEZUGS-REGISTERNUMMER BB-1055-B

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:1:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 48 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:1

CCCGGGCCAT GGCTACAGGT TTAACAGCTA AGACCGGAGT AGAGCACT 48

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:2

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 37 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:2:

GATATCGAAT TCTCATTATA GAACTCCAGC TTTTTTC 37

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:3:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 917 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) ORT: 13..911

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:3:

```
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) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:4:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 22 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:4:

CTTCCCGTGA CCATGGGCCA TC 22

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:5:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 1350 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) ORT: 1..1350

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:5:

```
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) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:6:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 36 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: *LINEAR*

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:6:

GATCCATGGC TGAAATTGTT GTCTCCAAAT TTGGCG 36

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:7:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 36 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:7:

GTACCGCCAA ATTTGGAGAC AACAATTTCA GCCATG 36

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:8:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 75 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:8:

CATGGCTGGC TTCCCCACGA GGAAGACCAA CAATGACATT ACCTCCATTG CTAGCAACGG 60

TGGAAGAGTA CAATG 75

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:9:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 75 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:9:

CATGCATTGT ACTCTTCCAC CGTTGCTAGC AATGGAGGTA ATGTCATTGT TGGTCTTCCT 60

CGTGGGGAAG CCAGC 75

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:10:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 90 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:10:

CATGGCTTCC TCAATGATCT CCTCCCCAGC TGTTACCACC GTCAACCGTG CCGGTGCCGG 60

CATGGTTGCT CCATTCACCG GCCTCAAAAG 90

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:11:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 90 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:11:

CATGCTTTTG AGGCCGGTGA ATGGAGCAAC CATGCCGGCA CCGGCACGGT TGACGGTGGT 60

AACAGCTGGG GAGGAGATCA TTGAGGAAGC 90

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:12:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 23 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:12:

CCGGTTTGCT GTAATAGGTA CCA 23

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:13:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 31 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRANGIGKEIT: EINSTRANGING

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:13:

AGCTTGGTAC CTATTACAGC AAACCGGCAT G 31

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:14:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 27 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:14:

GCTTCCTCAA TGATCTCCTC CCCAGCT 27

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:15:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 28 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:15:

CATTGTACTC TTCCACCGTT GCTAGCAA 28

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:16:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: VERSCHIEDENE_MERKMALE

(B) ORT: 1..20

(C) WEITERE INFORMATIONEN: /PRODUKT=''SYNTHETISCHES OLIGONUKLEOTID''

/STANDARD_NAME = "SM 70"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:16:

CTGACTCGCT GCGCTCGGTC 20

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:17:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 24 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: VERSCHIEDENE_MERKMALE

(B) ORT: 1..24

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /PRODUKT=''SYNTHETISCHES OLIGONUKLEOTID''

/STANDARD_NAME = "SM 71"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:17:

TATTTTCTCC TTACGCATCT GTGC 24

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:18:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 27 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: VERSCHIEDENE_MERKMALE

(B) ORT: 1..27

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /PRODUKT=''SYNTHETISCHES OLIGONUKLEOTID''

/STANDARD_NAME = "SM 78"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:18:

TTCATCGATA GGCGACCACA CCCGTCC 27

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:19:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 27 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: VERSCHIEDENE_MERKMALE

(B) ORT: 1..27

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /PRODUKT=''SYNTHETISCHES OLIGONUKLEOTID''/

STANDARD_NAME = "SM 79"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:19:

AATATCGATG CCACGATGCG TCCGGCG 27

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:20:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 55 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: VERSCHIEDENE_MERKMALE

(B) ORT: 1..55

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /PRODUKT=''SYNTHETISCHES

OLIGONUKLEOTID''/

STANDARD_NAME = "SM 81"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:20:

CATGGAGGAG AAGATGAAGG CGATGGAAGA GAAGATGAAG GCGTGATAGG TACCG 55

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:21:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 55 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: VERSCHIEDENE MERKMALE

(B) ORT: 1..55

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /PRODUKT=''SYNTHETISCHES

OLIGONUKLEOTID''

/STANDARD_NAME = "SM 80"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:21:

AATTCGGTAC CTATCACGCC TTCATCTTCT CTTCCATCGC CTTCATCTTC TCCTC 55

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:22

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 14 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(C) STRANGIGKEIT: UNBEKANNT

(D) TOPOLOGIE: UNBEKANNT

(II) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: VERSCHIEDENE MERKMALE

(B) ORT: 1..14

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /LABEL=NAME

/NOTE="BASENGEN"[(SSP5)2]

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:22:

Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Met Lys Ala
1 5 10

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:23:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 21 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: VERSCHIEDENE MERKMALE

(B) ORT: 1..21

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /PRODUKT=''SYNTHETISCHES

OLIGONUKLEOTID''

/STANDARDNAME = "SM 84"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:23:

GATGGAGGAG AAGATGAAGG C 21

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:24:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 21 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: VERSCHIEDENE MERKMALE

(B) ORT: 1..21

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /PRODUKT=''SYNTHETISCHES OLIGONUKLEOTID'' /STANDARDNAME = "SM 85"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:24:

ATCGCCTTCA TCTTCTCCTC C 21

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:25:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 21 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: VERSCHIEDENE MERKMALE

(B) ORT: 1..21

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /PRODUKT=''SYNTHETISCHES OLIGONUKLEOTID'' /STANDARDNAME = "SM 82"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:25:

GATGGAGGAG AAGCTGAAGG C 21

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:26:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 21 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: VERSCHIEDENE MERKMALE

(B) ORT: 1..21

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /PRODUKT=''SYNTHETISCHES OLIGONUKLEOTID'' /STANDARDNAME = "SM 83"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:26:

ATCGCCTTCA GCTTCTCCTC C 21

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:27:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 7 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: UNBEKANNT

(D) TOPOLOGIE: UNBEKANNT

(II) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:27:

Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala
1 5

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:28:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 7 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: UNBEKANNT

(D) TOPOLOGIE: UNBEKANNT

(II) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:28:

Met Glu Glu Lys Met Lys Ala
1 5

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:29:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 160 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: DOPPELT

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(VI) ORGINALQUELLE:

(B) STAMM: E. COLI

(G) ZELLTYP: DH5α

(VII) DIREKTE QUELLE:

(B) KLON: C15

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) ORT: 2..151

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /FUNKTION ="SYNTHETISCHES SPEICHERPROTEIN"
/PRODUKT = "PROTEIN"

/GEN = "SSP"

/STANDARD_NAME = "5.7.7.7.7.7.5"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:29:

```
C ATG GAG GAG AAG ATG AAG GCG ATG GAG GAG AAG CTG AAG GCG ATG     46
  Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met
   1               5                  10                  15

GAG GAG AAG CTG AAG GCG ATG GAG GAG AAG CTG AAG GCG ATG GAG GAG  94
Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu
                20                  25                  30

AAG CTG AAG GCG ATG GAG GAG AAG CTG AAG GCG ATG GAA GAG AAG ATG 142
Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Met
            35                  40                  45

AAG GCG TGATAGGTAC CG                                          160
Lys Ala
        50
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:30:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 49 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:30:

```
Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu
  1               5                  10                  15

Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys
            20                  25                  30

Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Met Lys
        35                  40                  45

Ala
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:31:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 160 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: DOPPELT

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(VI) ORGINALQUELLE:

(B) STAMM: E. COLI

(G) ZELLTYP: DH5α

(VII) DIREKTE QUELLE:

(B) KLON: C20

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) ORT: 2..151

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /FUNKTION ="SYNTHETISCHES SPEICHERPROTEIN"

/PRODUKT = "PROTEIN"

/GEN = "SSP"

/STANDARD_NAME = "5.7.7.7.7.7.5"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:31:

```
C ATG GAG GAG AAG ATG AAG GCG ATG GAG GAG AAG CTG AAG GCG ATG      46
  Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met
    1               5                  10                  15

GAG GAG AAG CTG AAG GCG ATG GAG GAG AAG CTG AAG GCG ATG GAG GAG    94
Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu
                20                  25                  30

AAG CTG AAG GCG ATG GAG GAG AAG CTG AAG GCG ATG GAA GAG AAG ATG  142
Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Met
            35                  40                  45

AAG GCG TGATAGGTAC CG                                           160
Lys Ala
        50
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:32:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 49 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:32:

```
Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu
  1               5                  10                  15

Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys
            20                  25                  30

Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Met Lys
        35                  40                  45

Ala
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:33:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 139 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: DOPPELT

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(VI) ORGINALQUELLE:

(B) STAMM: E. COLI

(G) ZELLTYP: DH5α

(VII) DIREKTE QUELLE:

(B) KLON: C30

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) ORT: 2..130

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /FUNKTION ="SYNTHETISCHES SPEICHERPROTEIN"

/PRODUKT = "PROTEIN"

/GEN = "SSP"

/STANDARD_NAME = "5.7.7.7.7.7.5"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:33:

```
C ATG GAG GAG AAG ATG AAG GCG ATG GAG GAG AAG CTG AAG GCG ATG      46
  Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met
    1               5                  10                  15

GAG GAG AAG CTG AAG GCG ATG GAG GAG AAG CTG AAG GCG ATG GAG GAG    94
Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu
                20                  25                  30

AAG CTG AAG GCG ATG GAA GAG AAG ATG AAG GCG TGATAGGTAC CG         139
Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Met Lys Ala
            35                  40
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:34:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 42 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:34:

```
Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu
 1               5                  10                  15

Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys
            20                  25                  30

Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Met Lys Ala
        35                  40
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:35:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 97 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: DOPPELT

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(VI) ORGINALQUELLE:

(B) STAMM: E. COLI

(G) ZELLTYP: DH5α

(VII) DIREKTE QUELLE:

(B) KLON: D16

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) ORT: 2..88

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /FUNKTION ="SYNTHETISCHES SPEICHERPROTEIN"
/PRODUKT = "PROTEIN"
/GEN = "SSP"
/STANDARD_NAME = "5.5.5.5"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:35:

```
C ATG GAG GAG AAG ATG AAG GCG ATG GAG GAG AAG ATG AAG GCG ATG    46
  Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met
   1               5                  10                  15

GAG GAG AAG ATG AAG GCG ATG GAA GAG AAG ATG AAG GCG TGATAGGTAC  95
Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Met Lys Ala
            20                  25

CG                                                              97
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:36:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 28 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:36:

```
Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu
 1               5                  10                  15

Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Met Lys Ala
            20                  25
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:37:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 118 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: DOPPELT

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(VI) ORGINALQUELLE:

(B) STAMM: E. COLI

(G) ZELLTYP: DH5α

(VII) DIREKTE QUELLE:

(B) KLON: D20

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) ORT: 2..109

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /FUNKTION ="SYNTHETISCHES SPEICHERPROTEIN"
/PRODUKT = "PROTEIN"
/GEN = "SSP"
/STANDARDNAME = "5.5.5.5.5"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:37:

```
C ATG GAG GAG AAG ATG AAG GCG ATG GAG GAG AAG ATG AAG GCG ATG     46
  Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met
   1               5                  10                  15

GAG GAG AAG ATG AAG GCG ATG GAG GAG AAG ATG AAG GCG ATG GAA GAG  94
Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu
                20                  25                  30

AAG ATG AAG GCG TGATAGGTAC CG                                   118
Lys Met Lys Ala
            35
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:38:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 35 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:38:

```
Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu
  1               5                  10                  15

Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys
             20                  25                  30

Met Lys Ala
         35
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:39:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 97 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: DOPPELT

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(VI) ORGINALQUELLE:

(B) STAMM: E. COLI

(G) ZELLTYP: DH5α

(VII) DIREKTE QUELLE:

(B) KLON: D33

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) ORT: 2..88

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /FUNKTION ="SYNTHETISCHES SPEICHERPROTEIN"
/PRODUKT = "PROTEIN"
/GEN = "SSP"
/STANDARDNAME = "5.5.5.5"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:39:

```
C ATG GAG GAG AAG ATG AAG GCG ATG GAG GAG AAG ATG AAG GCG ATG   46
  Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met
    1               5                  10                  15

GAG GAG AAG ATG AAG GCG ATG GAA GAG AAG ATG AAG GCG TGATAGGTAC  95
Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Met Lys Ala
                 20                  25

CG                                                             97
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:40:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 28 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:40:

```
Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu
 1               5                  10                  15

Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Met Lys Ala
            20                  25
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:41:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 21 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: VERSCHIEDENE MERKMALE

(B) ORT: 1..21

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /PRODUKT=''SYNTHETISCHES
OLIGONUKLEOTID''
/STANDARD_NAME = "SM 86"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:41

GATGGAGGAG AAGCTGAAGA A 21

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:42:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 21 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: VERSCHIEDENE MERKMALE

(B) ORT: 1..21

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /PRODUKT=''SYNTHETISCHES
OLIGONUKLEOTID''

STANDARD_NAME = "SM 87"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:42:

ATCTTCTTCA GCTTCTCCTC C 21

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:43:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 21 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: VERSCHIEDENE MERKMALE

(B) ORT: 1..21

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /PRODUKT=''SYNTHETISCHES OLIGONUKLEOTID''

/STANDARDNAME = "SM 88"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:44:

GATGGAGGAG AAGCTGAAGT G 21

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:44

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 21 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: VERSCHIEDENE MERKMALE

(B) ORT: 1..21

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /PRODUKT=''SYNTHETISCHES OLIGONUKLEOTID''

/STANDARDNAME = "SM 89"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:44:

ATCCACTTCA GCTTCTCCTC C 21

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:45:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 21 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: VERSCHIEDENE_MERKMALE

(B) ORT: 1..21

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /PRODUKT=''SYNTHETISCHES OLIGONUKLEOTID''

/STANDARD_NAME = "SM 90"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:45:

GATGGAGGAG AAGATGAAGA A 21

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:46:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 21 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: VERSCHIEDENE_MERKMALE

(B) ORT: 1..21

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /PRODUKT=''SYNTHETISCHES OLIGONUKLEOTID''

/STANDARD_NAME = "SM 91"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:46:

ATCTTCTTCA TCTTCTCCTC C 21

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:47:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 21 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: VERSCHIEDENE_MERKMALE

(B) ORT: 1..21

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /PRODUKT=''SYNTHETISCHES OLIGONUKLEOTID''

/STANDARD_NAME = "SM 92"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:47:

GATGGAGGAG AAGATGAAGT G 21

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:48:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 21 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: VERSCHIEDENE_MERKMALE

(B) ORT: 1..21

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /PRODUKT=''SYNTHETISCHES OLIGONUKLEOTID''

/STANDARD_NAME = "SM 93"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:48:

ATCCACTTCA TCTTCTCCTC C 21

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:49:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 7 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(C) STRANGIGKEIT: UNBEKANNT

(D) TOPOLOGIE: UNBEKANNT

(II) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:49:

Met Glu Glu Lys Leu Lys Lys
1 5

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:50:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 7 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: UNBEKANNT

(D) TOPOLOGIE: UNBEKANNT

(II) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:50:

```
Met Glu Glu Lys Leu Lys Trp
1               5
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:51:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 7 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: UNBEKANNT

(D) TOPOLOGIE: UNBEKANNT

(II) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:51:

```
Met Glu Glu Lys Met Lys Lys
1               5
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:52:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 7 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: UNBEKANNT

(D) TOPOLOGIE: UNBEKANNT

(II) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:52:

```
Met Glu Glu Lys Met Lys Trp
1               5
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:53:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 160 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: DOPPELT

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(VI) ORGINALQUELLE:

(B) STAMM: E. COLI

(G) ZELLTYP: DH5α

(VII) DIREKTE QUELLE:

(B) KLON: 82-4

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) ORT: 2..151

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /FUNKTION ="SYNTHETISCHES SPEICHERPROTEIN"

/PRODUKT = "PROTEIN"

/GEN = "SSP"

/STANDARD_NAME = "7.7.7.7.7.5"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:53:

```
C ATG GAG GAG AAG CTG AAG GCG ATG GAG GAG AAG CTG AAG GCG ATG    46
  Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met
    1               5                  10                  15

GAG GAG AAG CTG AAG GCG ATG GAG GAG AAG CTG AAG GCG ATG GAG GAG  94
Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu
                20                  25                  30

AAG CTG AAG GCG ATG GAG GAG AAG CTG AAG GCG ATG GAA GAG AAG ATG 142
Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Met
            35                  40                  45



AAG GCG TGATAGGTAC CG                                          160
Lys Ala
        50
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:54:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 49 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:54:

```
Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu
  1               5                  10                  15

Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys
            20                  25                  30

Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Met Lys
        35                  40                  45

Ala
```

2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:55:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 97 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: DOPPELT

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(VI) ORGINALQUELLE:

(B) STAMM: E. COLI

(G) ZELLTYP: DH5α

(VII) DIREKTE QUELLE:

(B) KLON: 84-H3

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) ORT: 2..88

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /FUNKTION ="SYNTHETISCHES SPEICHERPROTEIN"
/PRODUKT = "PROTEIN"
/GEN = "SSP"
/STANDARD_NAME = "5.5.5.5"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:55:

```
C ATG GAG GAG AAG ATG AAG GCG ATG GAG GAG AAG ATG AAG GCG ATG   46
  Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met
    1               5                  10                  15

GAG GAG AAG ATG AAG GCG ATG GAA GAG AAG ATG AAG GCG TGATAGGTAC  95
Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Met Lys Ala
                20                  25

CG                                                             97
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:56:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 28 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:56:

```
Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu
  1               5                  10                  15

Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Met Lys Ala
            20                  25
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:57:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 97 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRANGIGKEIT: DOPPELT

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(VI) ORGINALQUELLE:

(B) STAMM: E. COLI

(G) ZELLTYP: DH5α

(VII) DIREKTE QUELLE:

(B) KLON: 86-H23

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) ORT: 2..88

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /FUNKTION ="SYNTHETISCHES SPEICHERPROTEIN"

/PRODUKT = "PROTEIN"

/GEN = "SSP"

/STANDARD_NAME = "5.8.8.5"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:57:

```
C ATG GAG GAG AAG ATG AAG GCG ATG GAG GAG AAG CTG AAG AAG ATG   46
  Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Lys Met
    1               5                  10                  15

GAG GAG AAG CTG AAG AAG ATG GAA GAG AAG ATG AAG GCG TGATAGGTAC  95
Glu Glu Lys Leu Lys Lys Met Glu Glu Lys Met Lys Ala
                20                  25

CG                                                             97
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:58

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 28 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:58:

```
Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Lys Met Glu
  1               5                  10                  15

Glu Lys Leu Lys Lys Met Glu Glu Lys Met Lys Ala
            20                  25
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:59:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 112 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRANGIGKEIT: DOPPELT

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(VI) ORGINALQUELLE:

(B) STAMM: E. COLI

(G) ZELLTYP: DH5α

(VII) DIREKTE QUELLE:

(B) KLON: 88-2

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) ORT: 2..103

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /FUNKTION ="SYNTHETISCHES SPEICHERPROTEIN"

/PRODUKT = "PROTEIN"

/GEN = "SSP"

/STANDARD_NAME = "5.9.9.9.5"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:59:

```
C ATG GAG GAG AAG ATG AAG GCG AAG AAG CTG AAG TGG ATG GAG GAG    46
  Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Lys Lys Leu Lys Trp Met Glu Glu
    1               5                  10                  15

AAG CTG AAG TGG ATG GAG GAG AAG CTG AAG TGG ATG GAA GAG AAG ATG 94
Lys Leu Lys Trp Met Glu Glu Lys Leu Lys Trp Met Glu Glu Lys Met
                20                  25                  30

AAG GCG TGATAGGTAC CG                                          112
Lys Ala
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:60:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 33 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:60:

```
Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Lys Lys Leu Lys Trp Met Glu Glu Lys
  1               5                  10                  15

Leu Lys Trp Met Glu Glu Lys Leu Lys Trp Met Glu Glu Lys Met Lys
            20                  25                  30

Ala
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:61:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 118 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: DOPPELT

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(VI) ORGINALQUELLE:

(B) STAMM: E. COLI

(G) ZELLTYP: DH5α

(VII) DIREKTE QUELLE:

(B) KLON: 90-H8

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) ORT: 2..109

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /FUNKTION ="SYNTHETISCHES SPEICHERPROTEIN"

/PRODUKT = "PROTEIN"

/GEN = "SSP"

/STANDARD_NAME = "5.10.10.10.5"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:61:

```
C ATG GAG GAG AAG ATG AAG GCG ATG GAG GAG AAG ATG AAG AAG ATG    46
  Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Met Lys Lys Met
    1               5                  10                  15

GAG GAG AAG ATG AAG AAG ATG GAG GAG AAG ATG AAG AAG ATG GAA GAG 94
Glu Glu Lys Met Lys Lys Met Glu Glu Lys Met Lys Lys Met Glu Glu
                20                  25                  30

AAG ATG AAG GCG TGATAGGTAC CG                                   118
Lys Met Lys Ala
        35
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:62:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 35 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:62:

```
Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Met Lys Lys Met Glu
  1               5                  10                  15

Glu Lys Met Lys Lys Met Glu Glu Lys Met Lys Lys Met Glu Glu Lys
            20                  25                  30

Met Lys Ala
        35
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:63:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 97 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: DOPPELT

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(VI) ORGINALQUELLE:

(B) STAMM: E. COLI

(G) ZELLTYP: DH5α

(VII) DIREKTE QUELLE:

(B) KLON: 92-2

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) ORT: 2..88

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /FUNKTION ="SYNTHETISCHES SPEICHERPROTEIN"

/PRODUKT = "PROTEIN"

/GEN = "SSP"

/STANDARD_NAME = "5.11.11.5"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:63:

```
C ATG GAG GAG AAG ATG AAG GCG ATG GAG GAG AAG ATG AAG TGG ATG      46
  Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Met Lys Trp Met
    1               5                  10                  15

GAG GAG AAG ATG AAG TGG ATG GAA GAG AAG ATG AAG GCG TGATAGGTAC    95
Glu Glu Lys Met Lys Trp Met Glu Glu Lys Met Lys Ala
                20                  25

CG                                                               97
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:64:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 28 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:64:

```
Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Met Lys Trp Met Glu
  1               5                  10                  15

Glu Lys Met Lys Trp Met Glu Glu Lys Met Lys Ala
            20                  25
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:65:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 84 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: VERSCHIEDENE_MERKMALE

(A) ORT: 1..84

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /PRODUKT ="SYNTHETISCHES OLIGONUKLEOTID"

/STANDARD_NAME = "SM 96"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:65:

GATGGAGGAA AAGATGAAGG CGATGGAGGA GAAAATGAAA GCTATGGAGG AAAAGATGAA 60

AGCGATGGAG GAGAAAATGA AGGC 84

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:66:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 84 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: VERSCHIEDENE_MERKMALE

(B) ORT: 1..84

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /PRODUKT ="SYNTHETISCHES OLIGONUKLEOTID"

/STANDARDNAME = "SM 97"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:66:

ATCGCCTTCA TTTTCTCCTC CATCGCTTTC ATCTTTTCCT CCATAGCTTT CATTTTCTCC 60

TCCATCGCCT TCATCTTTTC CTCC 84

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:67:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 28 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: UNBEKANNT

(D) TOPOLOGIE: UNBEKANNT

(II) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: PROTEIN

(B) ORT: 1..28

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /LABEL=NAME

/NOTE="(SSP 5)4"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:67:

Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu
1 5 10 15

Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Met Lys Ala
20 25

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:68:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 84 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: VERSCHIEDENE_MERKMALE

(B) ORT: 1..84

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /PRODUKT ="SYNTHETISCHES

OLIGONUKLEOTID"

/STANDARD_NAME = "SM 98"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:68:

GATGGAGGAA AAGCTGAAAG CGATGGAGGA GAAACTCAAG GCTATGGAAG AAAAGCTTAA 60

AGCGATGGAG GAGAAACTGA AGGC 84

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:69:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 84 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: VERSCHIEDENE_MERKMALE

(B) ORT: 1..84

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /PRODUKT ="SYNTHETISCHES OLIGONUKLEOTID"

/STANDARD_NAME = "SM 99"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:69:

```
ATCGCCTTCA GTTTCTCCTC CTACGCTTTA AGCTTTTCTT CCATAGCCTT GAGTTTCTCC 60

TCCATCGCTT TCAGCTTTTC CTCC                                        84
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:70:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 28 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: UNBEKANNT

(D) TOPOLOGIE: UNBEKANNT

(II) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: PROTEIN

(B) ORT: 1..28

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /LABEL=NAME

/NOTE= “(SSP 7)4“

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:70:

```
Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu
1               5                  10                  15

Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala
            20                  25
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:71:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 84 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: VERSCHIEDENE_MERKMALE

(B) ORT: 1..84

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /PRODUKT ="SYNTHETISCHES OLIGONUKLEOTID"

/STANDARD_NAME = "SM 100"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:71:

GATGGAGGAA AAGCTTAAGA AGATGGAAGA AAAGCTGAAA TGGATGGAGG AGAAACTCAA 60

AAAGATGGAG GAAAAGCTTA AATG 84

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:72:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 84 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRANGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: VERSCHIEDENE_MERKMALE

(B) ORT: 1..84

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /PRODUKT ="SYNTHETISCHES OLIGONUKLEOTID"

/STANDARD_NAME = "SM 101"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:72:

ATCCATTTAA GCTTTTCCTC CTACTTTTTG AGTTTCTCCT CCATCCATTT CAGCTTTTCT 60

TCCATCTTCT TAAGCTTTTC CTCC 84

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:73:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 28 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: UNBEKANNT

(D) TOPOLOGIE: UNBEKANNT

(II) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:73:

Met Glu Glu Lys Leu Lys Lys Met Glu Glu Lys Leu Lys Trp Met Glu
1 5 10 15

Glu Lys Leu Lys Lys Met Glu Glu Lys Leu Lys Trp
20 25

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:74:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 243 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: DOPPELT

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(VI) ORGINALQUELLE:

(B) STAMM: E. COLI

(G) ZELLTYP: DH5α

(VII) DIREKTE QUELLEN:

(B) KLON: 2-9

(IX) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) ORT: 2..235

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /FUNKTION ="SYNTHETISCHES SPEICHERPROTEIN"

/PRODUKT = "PROTEIN"

/GEN = "SSP"

/STANDARD_NAME = "7.7.7.7.7.7.8.9.8.9.5"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:74:

```
C ATG GAG GAG AAG CTG AAG GCG ATG GAG GAG AAG CTG AAG GCG ATG        46
  Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met
    1               5                  10                  15

GAG GAG AAG CTG AAG GCG ATG GAG GAG AAG CTG AAG GCG ATG GAG GAG      94
Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu
                20                  25                  30

AAG CTG AAG GCG ATG GAG GAG AAG CTG AAG GCG ATG GAG GAA AAG CTT     142
Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu
            35                  40                  45

AAG AAG ATG GAA GAA AAG CTG AAA TGG ATG GAG GAG AAA CTC AAA AAG     190
Lys Lys Met Glu Glu Lys Leu Lys Trp Met Glu Glu Lys Leu Lys Lys
        50                  55                  60

ATG GAG GAA AAG CTT AAA TGG ATG GAA GAG AAG ATG AAG GCG TGATAGGTAC 242
Met Glu Glu Lys Leu Lys Trp Met Glu Glu Lys Met Lys Ala
    65                  70                  75

C                                                                  243
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:75:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 77 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:75:

```
Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu
 1               5                  10                  15

Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys
            20                  25                  30

Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys
        35                  40                  45

Lys Met Glu Glu Lys Leu Lys Trp Met Glu Glu Lys Leu Lys Lys Met
    50                  55                  60

Glu Glu Lys Leu Lys Trp Met Glu Glu Lys Met Lys Ala
65                  70                  75
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:76

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 175 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: DOPPELT

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(VI) ORGINALQUELLE:

(B) STAMM: E. COLI

(G) ZELLTYP: DH5α

(VII) DIREKTE QUELLE:

(B) KLON: 5-1

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) ORT: 2..172

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /FUNKTION ="SYNTHETISCHES SPEICHERPROTEIN"
/PRODUKT = "PROTEIN"
/GEN = "SSP"
/STANDARD_NAME = "5.5.5.7.7.7.7.5"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:76:

```
C ATG GAG GAG AAG ATG AAG GCG ATG GAG GAG AAG ATG AAG GCG ATG     46
  Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met
    1               5                  10                  15

GAG GAG AAG ATG AAG GCG ATG GAG GAA AAG CTG AAA GCG ATG GAG GAG  94
Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu
                20                  25                  30

AAA CTC AAG GCT ATG GAA GAA AAG CTT AAA GCG ATG GAG GAG AAA CTG 142
Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu
            35                  40                  45

AAG GCC ATG GAA GAG AAG ATG AAG GCG TGATAG                      179
Lys Ala Met Glu Glu Lys Met Lys Ala
        50                  55
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:77:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 56 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:77:

```
Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu
  1               5                  10                  15

Glu Lys Met Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys
            20                  25                  30

Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys
        35                  40                  45

Ala Met Glu Glu Lys Met Lys Ala
    50                  55
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:78:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 187 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: DOPPELT

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(VI) ORGINALQUELLE:

(B) STAMM: E. COLI

(G) ZELLTYP: DH5α

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) ORT: 3.:173

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /FUNKTION ="SYNTHETISCHES SPEICHERPROTEIN"
/PRODUKT = "PROTEIN"
/GEN = "SSP"
/STANDARDNAME = "SPP-3-5"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:78:

```
CC ATG GAG GAG AAG CTG AAG GCG ATG GAG GAG AAG CTG AAG GCG ATG     47
   Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met
     1               5                  10                  15

GAG GAG AAG CTG AAG GCG ATG GAG GAG AAG CTG AAG GCG ATG GAG GAG    95
Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu
                 20                  25                  30

AAG CTG AAG GCG ATG GAG GAG AAG CTG AAG GCG ATG GAG GAA AAG ATG  143
Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Met
            35                  40                  45

AAG GCG ATG GAA GAG AAG ATG AAG GCG TGATAGGTAC CGAATTC           187
Lys Ala Met Glu Glu Lys Met Lys Ala
         50                  55
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:79:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 56 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: UNBEKANNT

(D) TOPOLOGIE: UNBEKANNT

(II) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:79:

```
Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu
  1               5                  10                  15

Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys
            20                  25                  30

Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Leu Lys Ala Met Glu Glu Lys Met Lys
         35                  40                  45

Ala Met Glu Glu Lys Met Lys Ala
      50                  55
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:80:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 61 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: VERSCHIEDENE_MERKMALE

(B) ORT: 1..61

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /PRODUKT ="SYNTHETISCHES OLIGONUKLEOTID"
/STANDARD_NAME = "SM 107"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:80:

CATGGAGGAG AAGATGAAAA AGCTCGAAGA GAAGATGAAG GTCATGAAGT GATAGGTACC 60

G 61

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:81:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 61 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: VERSCHIEDENE_MERKMALE

(B) ORT: 1..61

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /PRODUKT ="SYNTHETISCHES OLIGONUKLEOTID"
/STANDARD_NAME = "SM 106"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:81:

AATTCGGTAC CTATCACTTC ATGACCTTCA TCTTCTCTTC GAGCTTTTTC ATCTTCTCCT 60

C 61

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:82:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 16 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄUREN

(C) STRÄNGIGKEIT: UNBEKANNT

(D) TOPOLOGIE: UNBEKANNT

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: PROTEIN

(B) ORT: 1..16

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /LABEL=NAME

/NOTE="PSK 34 BASENGEN"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:82:

Met Glu Glu Lys Met Lys Lys Leu Glu Glu Lys Met Lys Val Met Lys
1 5 10 15

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:83:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 63 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: VERSCHIEDENE_MERKMALE

(B) ORT: 1..63

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /PRODUKT ="SYNTHETISCHES

OLIGONUKLEOTID"

/STANDARD_NAME = "SM 110"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:83:

GCTGGAAGAA AAGATGAAGG CTATGGAGGA CAAGATGAAA TGGCTTGAGG AAAAGATGAA 60

GAA 63

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:84:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 63 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: VERSCHIEDENE _MERKMALE

(B) ORT: 1..63

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /PRODUKT ="SYNTHETISCHES

OLIGONUKLEOTID"

/STANDARD_NAME = "SM 111"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:84:

AGCTTCTTCA TCTTTTCCTC AAGCCATTTC ATCTTGTCCT CCATAGCCTT CATCTTTTCT 60

TCC 63

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:85:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 37 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:85:

Met Glu Glu Lys Met Lys Lys Leu Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu
1 5 10 15

Asp Lys Met Lys Trp Leu Glu Glu Lys Met Lys Lys Leu Glu Glu Lys
20 25 30

Met Lys Val Met Lys
35

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:86

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 37 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:86:

Met Glu Glu Lys Met Lys Lys Leu Glu Glu Lys Met Lys Ala Met Glu
1 5 10 15

Asp Lys Met Lys Trp Leu Glu Glu Lys Met Lys Lys Leu Glu Glu Lys
20 25 30

Met Lys Val Met Lys
35

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:87:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 62 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: VERSCHIEDENE_MERKMALE

(B) ORT: 1..62

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /PRODUKT ="SYNTHETISCHES OLIGONUKLEOTID"
/STANDARD_NAME = "SM 112"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:87:

GCTCGAAGAA AGATGAAGGC AATGGAAGAC AAAATGAAGT GGCTTGAGGA GAAAATGAAG 60

AA 62

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:88:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 62 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: VERSCHIEDENE_MERKMALE

(B) ORT: 1..62

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /PRODUKT ="SYNTHETISCHES OLIGONUKLEOTID"
/STANDARD_NAME = "SM 113"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:88:

AGCTTCTTCA TTTTCTCCTC AAGCCACTTC ATTTTGTCTT CCATTGCCTT CATCTTTCTT 60

CG 62

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:89:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 37 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:89:

Met Glu Glu Lys Met Lys Lys Leu Lys Glu Glu Met Ala Lys Met Lys
1 5 10 15

Asp Glu Met Trp Lys Leu Lys Glu Glu Met Lys Lys Leu Glu Glu Lys
20 25 30

Met Lys Val Met Lys
35

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:90:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 63 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: VERSCHIEDENE_MERKMALE

(B) ORT: 1..63

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /PRODUKT ="SYNTHETISCHES OLIGONUKLEOTID"
/STANDARD_NAME = "SM 114"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:90:

GCTCAAGGAG GAAATGGCTA AGATGAAAGA CGAAATCTGG AAACTGAAAG AGGAAATGAA 60

GAA 63

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:91:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 63 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(IX) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: VERSCHIEDENE MERKMALE

(B) ORT: 1..63

(D) WEITERE INFORMATIONEN: /PRODUKT ="SYNTHETISCHES OLIGONUKLEOTID"
/STANDARD_NAME = "SM 115"

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:91:

AGCTTCTTCA TTTCCTCTTT CAGTTTCCAC ATTTCGTCTT TCATCTTAGC CATTTCCTCC 60

TTG 63

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:92:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 107 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:92:

```
Met Glu Glu Lys Met Lys Lys Leu Lys Glu Glu Met Ala Lys Met Lys
 1               5                  10                  15

Asp Glu Met Trp Lys Leu Lys Glu Glu Met Lys Lys Leu Glu Glu Lys
            20                  25                  30

Met Lys Val Met Glu Glu Lys Met Lys Lys Leu Glu Glu Lys Met Lys
        35                  40                  45

Ala Met Glu Asp Lys Met Lys Trp Leu Glu Glu Lys Met Lys Lys Leu
    50                  55                  60

Glu Glu Lys Met Lys Val Met Glu Glu Lys Met Lys Lys Leu Glu Glu
65                  70                  75                  80

Lys Met Lys Ala Met Glu Asp Lys Met Lys Trp Leu Glu Glu Lys Met
                85                  90                  95

Lys Lys Leu Glu Glu Lys Met Lys Val Met Lys
            100                 105
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:93:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 43 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:93:

CTAGAAGCCT CGGCAACGTC AGCAACGGCG GAAGAATCCG GTG 43

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:94:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 43 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:94:

CATGCACCGG ATTCTTCCGC CGTTGCTGAC GTTGCCGAGG CTT 43

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:95:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 55 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:95:

GATCCCATGG CGCCCCTTAA GTCCACCGCC AGCCTCCCCG TCGCCCGCCG CTCCT 55

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:96:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 55 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:96:

CTAGAGGAGC GGCGGGCGAC GGGGAGGCTG GCGGTGGACT TAAGGGGCGC CATGG 55

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:97:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 59 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:97:

CATGGCGCCC ACCGTGATGA TGGCCTCGTC GGCCACCGCC GTCGCTCCGT TCCAGGGGC 59

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:98:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 59 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:98:

TTAAGCCCCT GGAACGGAGC GACGGCGGTG GCCGACGAGG CCATCATCAC GGTGGGCGC 59

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:99:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 16 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:99:

GCGCCCACCG TGATGA 16

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO:100:

(I) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 16 BASENPAARE

(B) TYP: NUKLEINSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINSTRÄNGIG

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(II) MOLEKÜLTYP: DNA (GENOMISCHE)

(XI) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:100:

CACCGGATTC TTCCGC 16

Patentansprüche

1. Chimäres Gen, wobei ein Nukleinsäurefragment, das Dihydrodipicolinsäuresynthase kodiert, die gegen Inhibition durch Lysin unempfindlich ist, auf funktionsfähige Weise mit einer Monokotchloroplasttransitsequenz und einer monokoten samenspezifischen Regulationssequenz verknüpft ist.

2. Chimäres Gen nach Anspruch 1, wobei die monokote samenspezifische Regulationssequenz ein monokoter embryospezifischer Promotor ist.

3. Chimäres Gen nach Anspruch 2, wobei das Nukleinsäurefragment, das Dihydrodipicolinsäuresynthase kodiert, die Nukleotidsequenz umfasst, die in SEQ ID NO:3 gezeigt ist, die Dihydrodipicolinsäuresynthase aus Corynebacterium glutanicum kodiert, und wobei die Pflanzenchloroplasttransitsequenz von einem Gen deriviert ist, das die kleine Untereinheit von Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase aus Zea-Mais kodiert, und die samenspezifische Regulationssequenz aus dem Globulin 1-Gen aus Zea-Mais stammt.

4. Nukleinsäurefragment umfassend:
(a) ein erstes chimäres Gen, wobei ein Nukleinsäurefragment, das Dihydrodipicolinsäuresynthase kodiert, die gegen Inhibition durch Lysin unempfindlich ist, auf funktionsfähige Weise mit einer Pflanzenchloroplasttransitsequenz und einer pflanzensamenspezifischen Regulationssequenz verknüpft und
(b) ein zureites chimäres Gen, wobei ein Nukleinsäurefragment, das ein an Lysin reiches Protein kodiert, wobei der Gewichtsprozentsatz von Lysin mindestens 15% beträgt, funktionsfähig mit einer pflanzensamenspezifischen Regulationssequenz verknüpft ist.

5. Nukleinsäurefragment nach Anspruch 4, wobei das zureite chimäre Gen folgendes umfasst:
ein Nukleinsäurefragment, das ein lysinreiches Protein kodiert, umfasst eine Nukleinsäuresequenz, die ein Protein kodiert, das n Heptadeinheiten (defgabc) umfasst, wobei jedes Heptad entweder gleich oder verschieden ist, wobei:
n mindestens 4 beträgt,
a und d unabhängig aus der Gruppe ausgewählt sind bestehend aus Met, Leu, Val, Ile und Thr,
e und g unabhängig aus der Gruppe ausgewählt sind bestehend aus den Säure/Basenpaaren Glu/Lys, Lys/Glu, Arg/Glu, Arg/Asp, Lys/Asp, Glu/Arg, Asp/Arg und Asp/Lys; und
b, c und f unabhängig irgendwelche Aminosäuren, mit Ausnahme von Gly oder Pro, sind und mindestens zurei Aminosäuren von b, c und f in jedem Heptad aus der Gruppe ausgewählt sind bestehend aus Glu, Lys, Asp, Arg, His, Thr, Ser, Asn, Ala, Gin und Cys,
wobei das Nukleinsäurefragment funktionsfähig mit einer pflanzensamenspezifischen Regulationssequenz verknüpft ist.

6. Nukleinsäurefragment nach Anspruch 4, wobei das zureite chimäre Gen ein Nukleinsäurefragment umfasst, das ein lysinreiches Protein kodiert, das eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die ein Protein kodiert, das die Aminosäuresequenz $(MEEKLKA)_6(MEEKMKA)_2$ aufweist, die funktionsfähig mit einer pflanzensamenspezifischen Regulationssequenz verknüpft ist.

7. Nukleinsäurefragment umfassend:
(a) ein erstes chimäres Gen, wobei ein Nukleinsäurefragment, das Dihydrodipicolinsäuresynthase kodiert, die gegen Inhibition durch Lysin unempfindlich ist, auf funktionsfähige Weise mit einer Pflanzenchloroplasttran-

sitsequenz und einer pflanzensamenspezifischen Regulationssequenz verknüpft ist und
(b) ein zureites chimäres Gen umfassend ein Nukleinsäurefragment, das eine Lysirilcetoglutaratreductase kodiert, funktionsfähig in der Sinn- oder Gegensinnorientierung mit einer pflanzensamenspezifischen Regulationssequenz verknüpft ist.

8. Maispflanze umfassend in ihrem Genom das chimäre Gen nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3.

9. Samen, der von der Maispflanze nach Anspruch 8 erhalten worden ist, der das chimäre Gen nach Anspruch 1 umfasst.

10. Methode zum Erhalten einer Rapssamen-, Sojabohnen- oder Maispflanze, wobei die Samen der Pflanze Lysin in einem zehn Prozent bis vierhundert Prozent höheren Niveau aufspeichern als die Samen einer untransformierten Pflanze, umfassend:
(a) das Transformieren von Rapssamen-, Sojabohnen- oder Maispflanzenzellen mit einem chimären Gen umfassend ein Nukleinsäurefragment, das Dihydrodipicolinsäuresynthase kodiert, die gegen Inhibition durch Lysin unempfindlich ist, und die funktionsfähig mit einer Pflanzenchloroplasttransitsequenz und einer pflanzensamenspezifischen Regulationssequenz verknüpft ist;
(b) das Regenerieren fruchtbarer reifer Pflanzen aus den aus Schritt (a) erhaltenen transformierten Pflanzenzellen unter Bedingungen, die zum Erhalten von Samen geeignet sind;
(c) das Screenen des Abkömmlingsamens aus Schritt (b) auf den Lysingehalt; und
(d) das Auswählen derjenigen Pflanzen, deren Samen erhöhte Niveaus an Lysin enthalten, die zehn Prozent bis vierhundert Prozent höher liegen als diejenigen der Samen einer untransformierten Pflanze.

11. Verfahren nach Anspruch 10 zum Erhalten einer Maispflanze, wobei die Lysinerhöhung in den Samen zehn Prozent bis einhundertdreissig Prozent höher ist als in Samen einer untransformierten Maispflanze.

12. Methode nach Anspruch 10, wobei das chimäre Gen aus Schritt (a) die Nukleotidsequenz umfasst, die in SEQ ID NO:3 gezeigt ist, die Dihydrodipicolinsäuresynthase aus Coynebacterium glutamicum kodiert, und wobei die Pflanzenchloroplasttransitsequenz aus einem Gen deriviert ist, das die kleine Untereinheit von Ribulose-1,5-Bisphosphatcarboxylase aus Glycine max kodiert, und wobei die samenspezifische Regulationssequenz aus dem Gen stammt, das die Untereinheit des Samenspeicherproteinphaseolins aus der Bohne Phaseolus vulgaris kodiert oder die samenspezifische Regulationssequenz aus dem Kunitz-Trypsininhibitor-3-Gen aus Glycine max stammt.

13. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, wobei die samenspezifische Regulationssequenz ein monokoter embryospezifischer Promotor ist und wobei die Pflanzenzelle nach Anspruch 10(a) aus Mais stammt.

14. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, wobei die Pflanzenzelle von (a) aus Mais stammt und wobei das chimäre Gen aus Schritt (a) die Nukleotidsequenz umfasst, die in SEQ ID NO:3 gezeigt ist, die Dihydrodipicolinsäuresynthase aus Corynebacterium glutamicum kodiert, und wobei die Pflanzenchloroplasttransitsequenz aus einem Gen deriviert ist, das die kleine Untereinheit von Ribulose-1,5-Bisphosphatcarboxylase aus Zea-Mais kodiert, und wobei die samenspezifische Regulationssequenz aus dem Globilin 1-Gen von Zea-Mais stammt.

15. Rapssamen-, Sojabohnen- oder Maispflanze, die in ihrem Genom das Nukleinsäurefragment nach Anspruch 4, 5, 6 oder 7 aufweist.

16. Rapssamen-, Sojabohnen- oder Maissamen, enthaltend das Nukleinsäurefragment nach Anspruch 4, 5, 6 oder 7.

17. Maispflanze, die mit dem chimären Gen nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3 transformiert worden ist oder Rapssamen-, Sojabohnen- oder Maispflanze, die mit dem Nukleinsäurefragment nach irgendeinem der Ansprüche 4 bis 7 transformiert worden ist, wobei die aus der Pflanze erhaltenen Samen Lysin in einem zehn Prozent bis vierhundert Prozent höheren Niveau aufspeichern als die Samen einer untransformierten Pflanze.

18. Samen, die aus einer Maispflanze erhalten worden sind, die mit dem chimären Gen nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3 transformiert worden ist, oder die aus einer Rapssamen-, Sojabohnen- oder Maispflanze erhalten worden sind, die mit dem Nukleinsäurefragment nach irgendeinem der Ansprüche 4 bis 7 transformiert worden ist, die Lysin in einem zehn Prozent bis vierhundert Prozent höheren Niveau enthalten als die Samen,

die aus untransformierten Pflanzen erhalten worden sind.

19. Maissamenzelle, die mit einem chimären Gen nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3 transformiert worden ist oder Rapssamen-, Sojabohnen- oder Maispflanzenzelle, die mit einem Nukleinsäurefragment nach irgendeinem der Ansprüche 4 bis 7 transformiert worden ist, wobei die aus einer Pflanze erhaltenen Samen, die aus der transformierten Pflanzenzelle regeneriert worden sind, Lysin in einem zehn Prozent bis vierhundert Prozent höheren Niveau aufspeichern als Samen, die aus einer Pflanze erhalten worden sind, die aus untransformierten Pflanzenzelle regeneriert worden ist.

20. Aus Samen nach Anspruch 18 deriviertes Samenmehl.

Es folgen 13 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

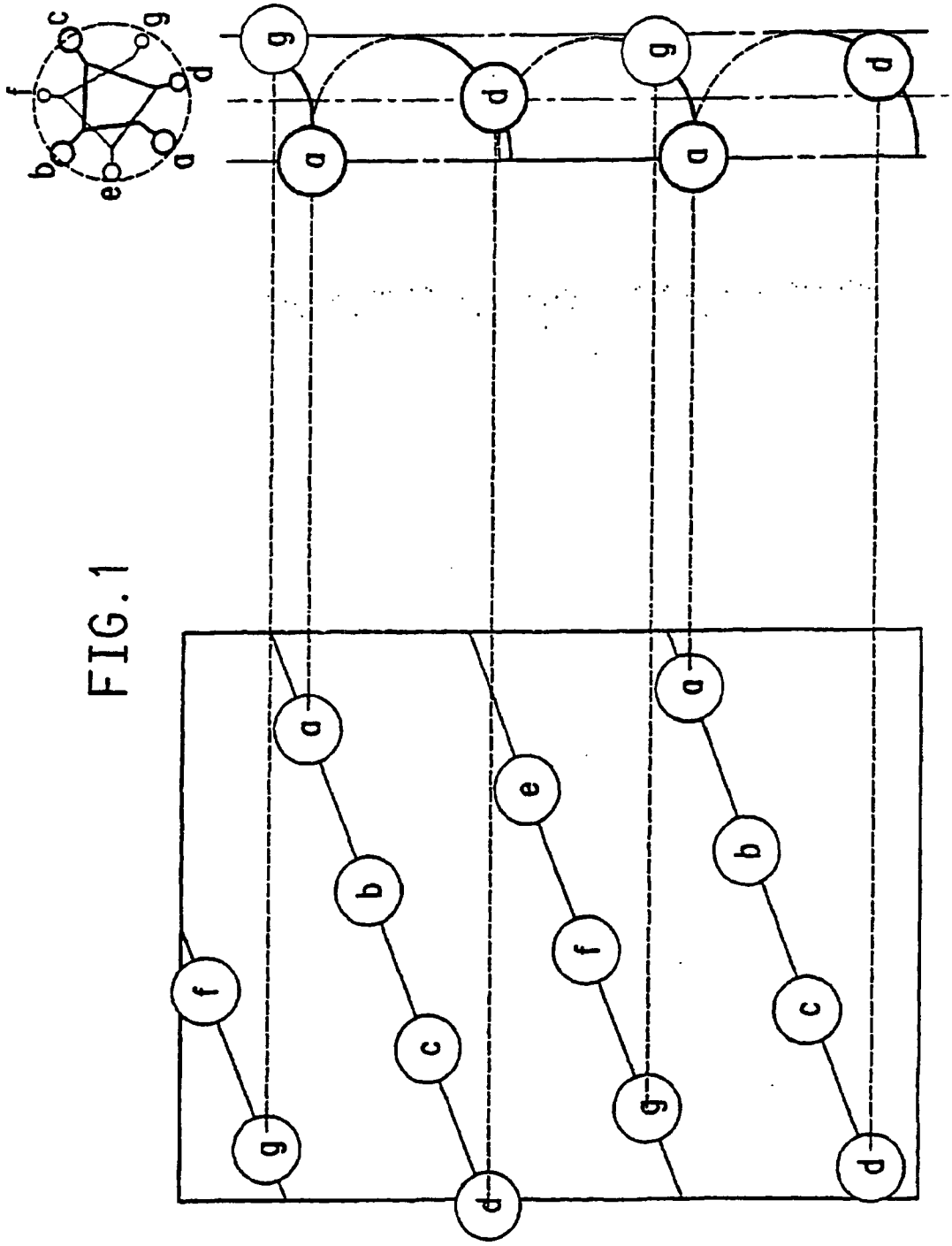


FIG. 1

FIG.2A

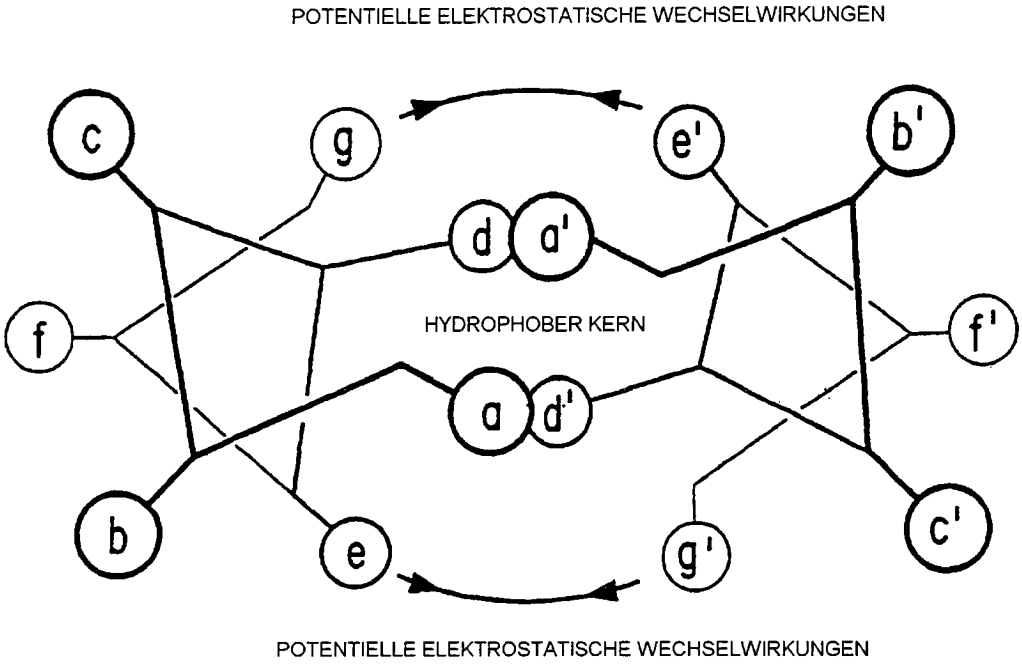

POTENTIELLE ELEKTROSTATISCHE WECHSELWIRKUNGEN
c
g
e'
b'
d
a'
HYDROPHOBER KERN
f
f'
a
d'
b
e
g'
c'
POTENTIELLE ELEKTROSTATISCHE WECHSELWIRKUNGEN

FIG.2B

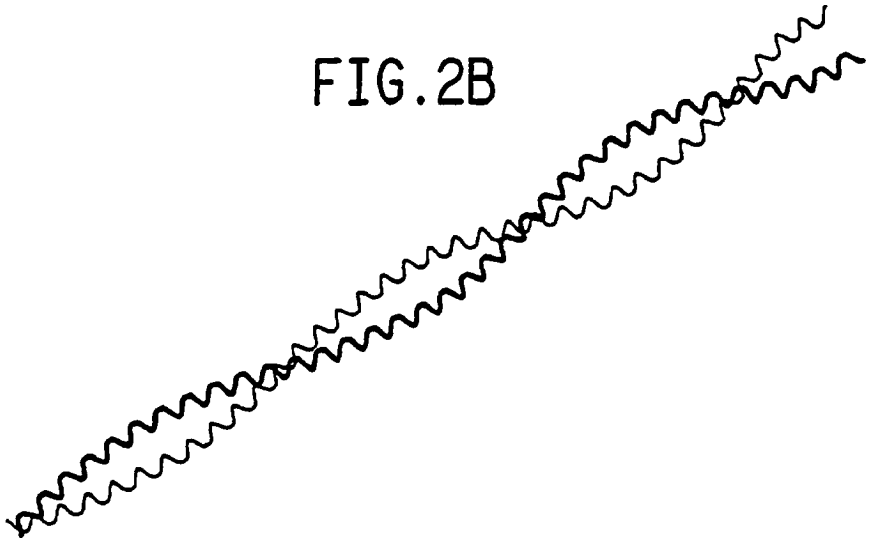
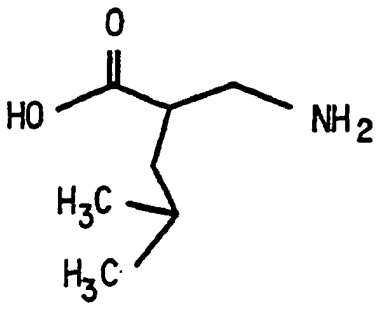
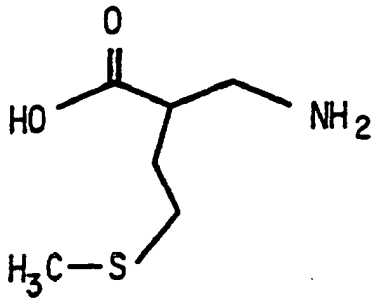


FIG.3A



LEUCIN

FIG.3B



METHIONIN

FIG.4



5'-Phaseolin 3'-Phaseolin

FIG.5A

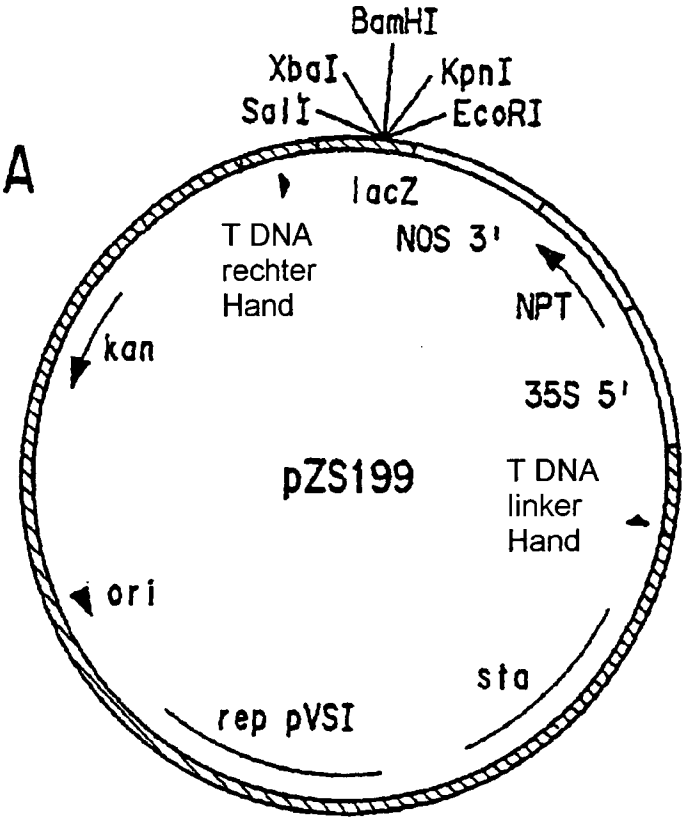

BamHI
XbaI
SalI
KpnI
EcoRI
lacZ
T DNA
rechter
Hand
NOS 3'
NPT
kan
35S 5'
pZS199
T DNA
linker
Hand
ori
sta
rep pVSI

FIG.5B

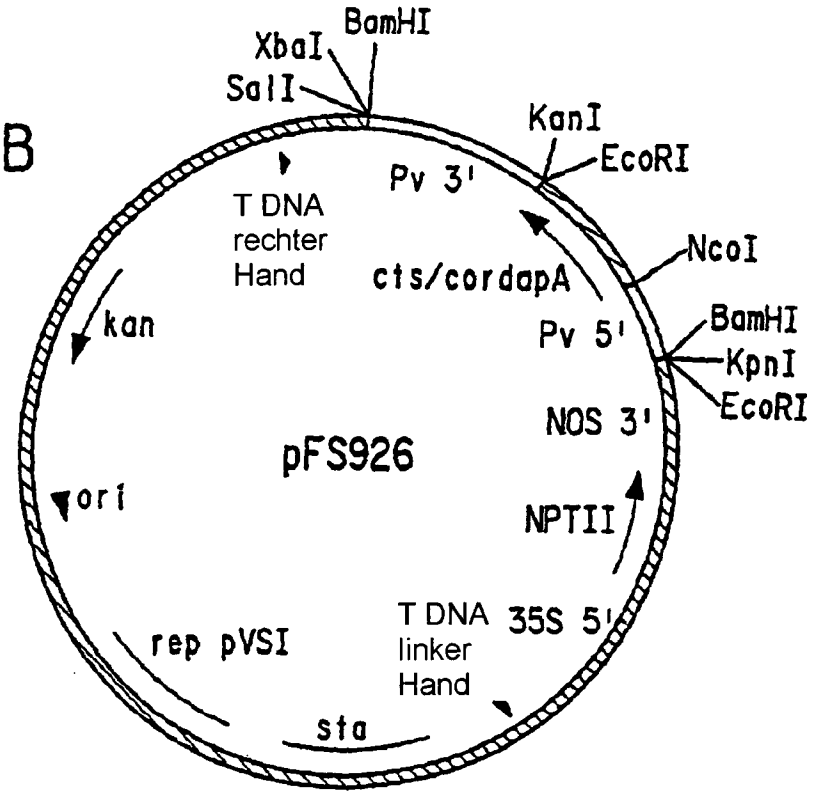

BamHI
XbaI
SalI
KanI
EcoRI
Pv 3'
T DNA
rechter
Hand
NcoI
cts/cordapA
kan
Pv 5'
BamHI
KpnI
EcoRI
NOS 3'
pFS926
ori
NPTII
T DNA
linker
Hand
35S 5'
rep pVSI
sta

FIG.6A

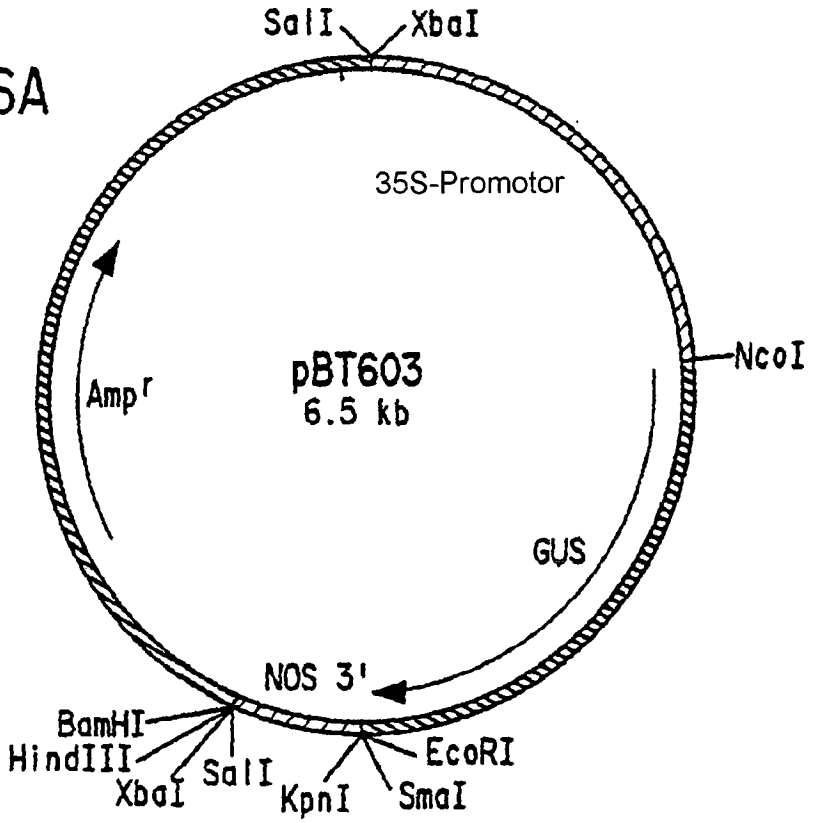
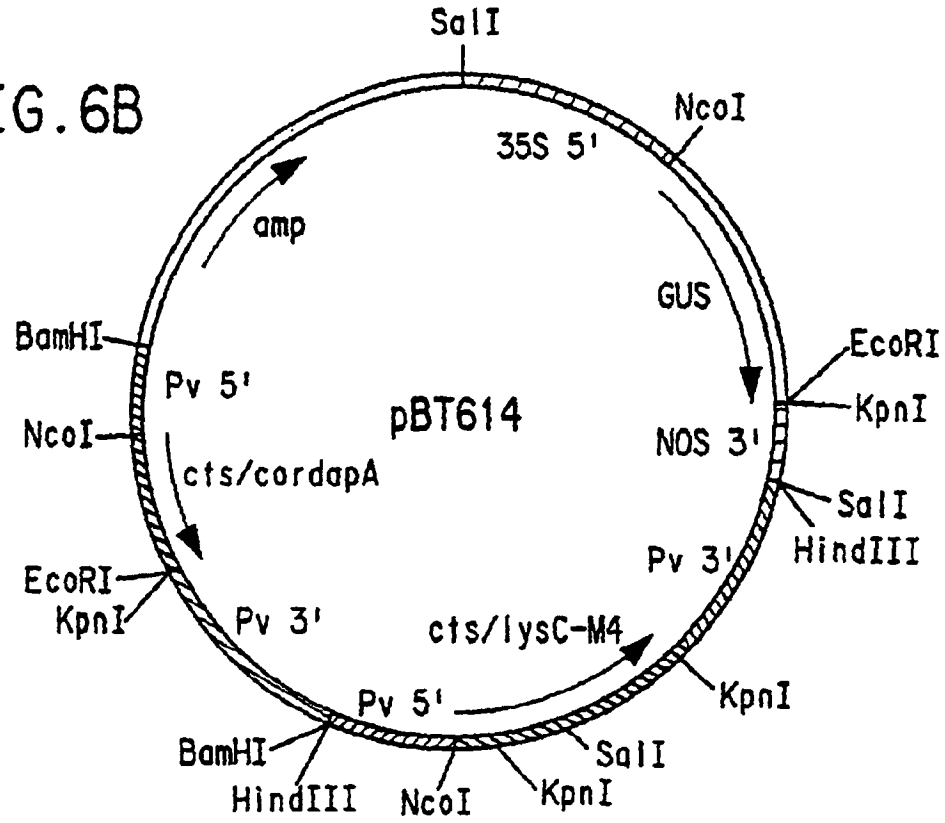

SalI
XbaI
35S-Promotor
NcoI
pBT603
6.5 kb
Amp r
GUS
NOS 3'
BamHI
HindIII
XbaI
SalI
KpnI
SmaI
EcoRI

FIG.6B


SalI
NcoI
35S 5'
amp
GUS
BamHI
EcoRI
Pv 5'
KpnI
pBT614
NcoI
NOS 3'
cts/cordapA
SalI
HindIII
Pv 3'
EcoRI
KpnI
Pv 3'
cts/lysC-M4
KpnI
Pv 5'
SalI
BamHI
HindIII
NcoI
KpnI

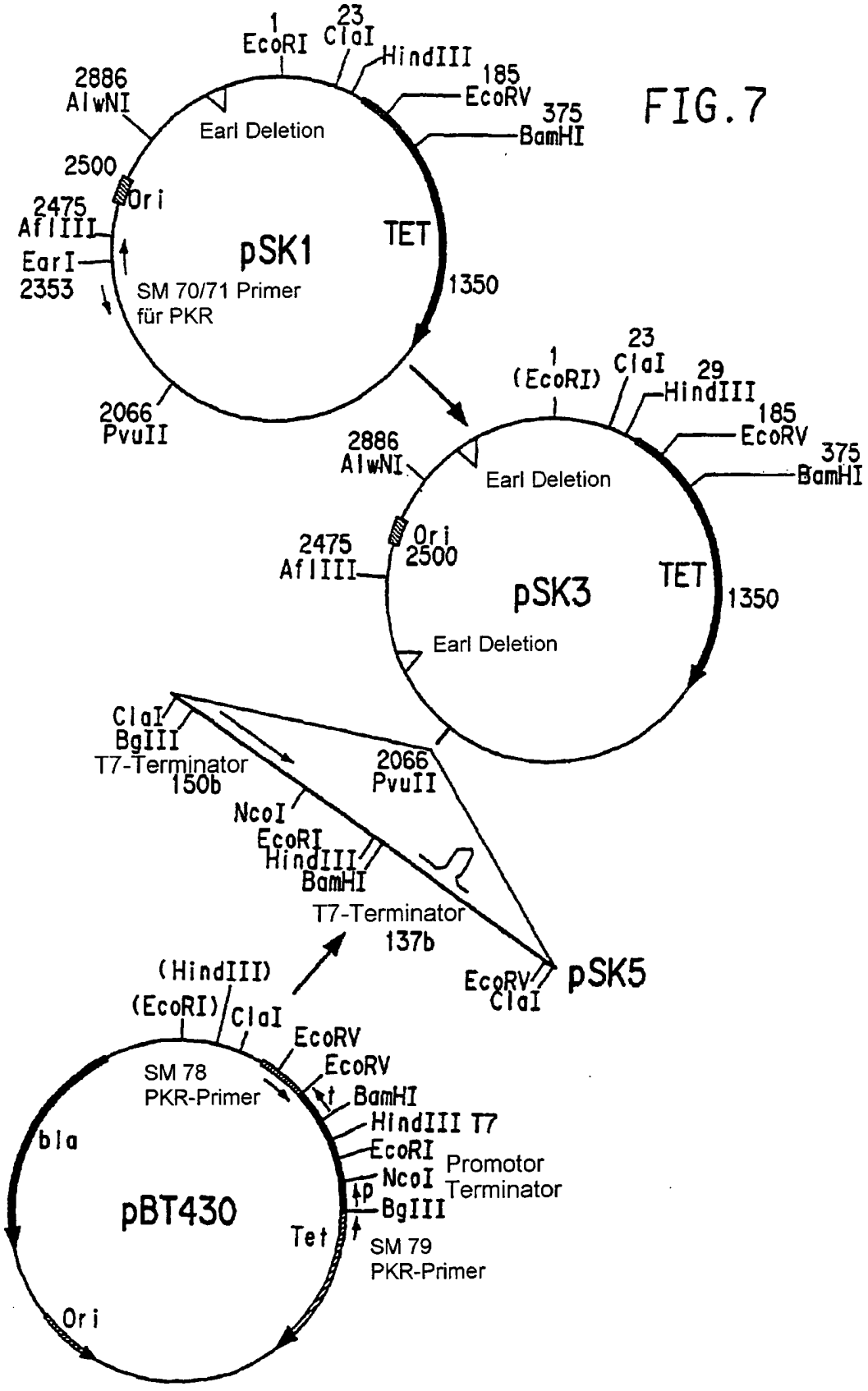

1
EcoRI
23
ClaI
HindIII
185
EcoRV
375
BamHI
2886
AlwNI
EarI Deletion
2500
Ori
2475
AflIII
EarI
2353
SM 70/71 Primer
für PKR
pSK1
TET
1350
2066
PvuII
1
(EcoRI)
23
ClaI
29
HindIII
185
EcoRV
375
BamHI
2886
AlwNI
EarI Deletion
2475
AflIII
Ori
2500
pSK3
TET
1350
EarI Deletion
ClaI
BglII
T7-Terminator
150b
2066
PvuII
NcoI
EcoRI
HindIII
BamHI
T7-Terminator
137b
pSK5
EcoRV
ClaI
(HindIII)
(EcoRI)
ClaI
EcoRV
EcoRV
SM 78
PKR-Primer
BamHI
HindIII T7
EcoRI
NcoI
BglII
Promotor
Terminator
SM 79
PKR-Primer
bla
pBT430
Tet
Ori

FIG.7

FIG.8

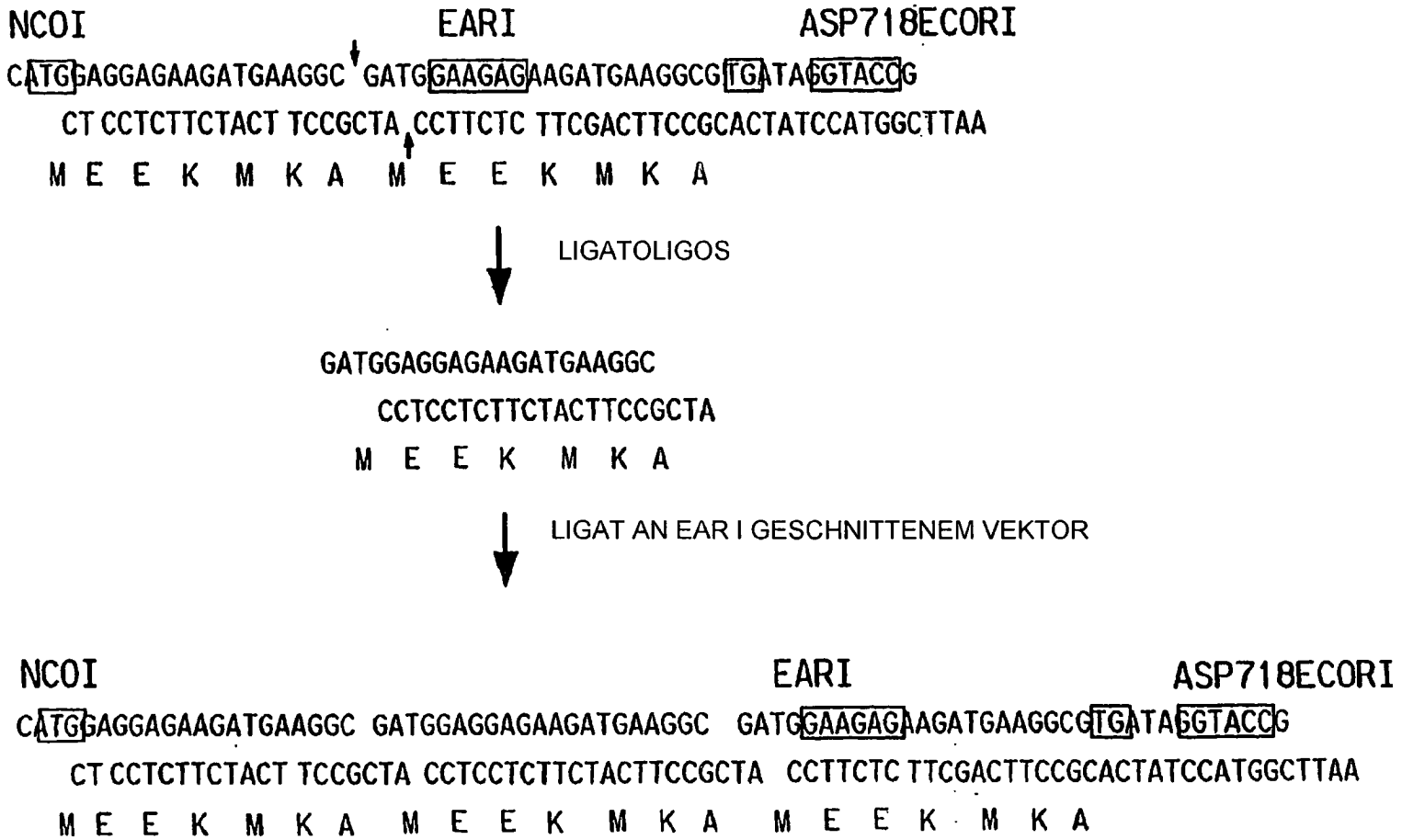

NCOI
EARI
ASP718ECORI
CATGGAGGAGAAGATGAAGGC GATGGAAGAGAAGATGAAGGCGTGATAGGTACCG
CT CCTCTTCTACT TCCGCTA CCTTCTC TTCGACTTCCGCACTATCCATGGCTTAA
M E E K M K A M E E K M K A
LIGATOLIGOS
GATGGAGGAGAAGATGAAGGC
CCTCCTCTTCTACTTCCGCTA
M E E K M K A
LIGAT AN EAR I GESCHNITTENEM VEKTOR
NCOI
EARI
ASP718ECORI
CATGGAGGAGAAGATGAAGGC GATGGAGGAGAAGATGAAGGC GATGGAAGAGAAGATGAAGGCGTGATAGGTACCG
CT CCTCTTCTACT TCCGCTA CCTCCTCTTCTACTTCCGCTA CCTTCTC TTCGACTTCCGCACTATCCATGGCTTAA
M E E K M K A M E E K M K A M E E K M K A

FIG.9

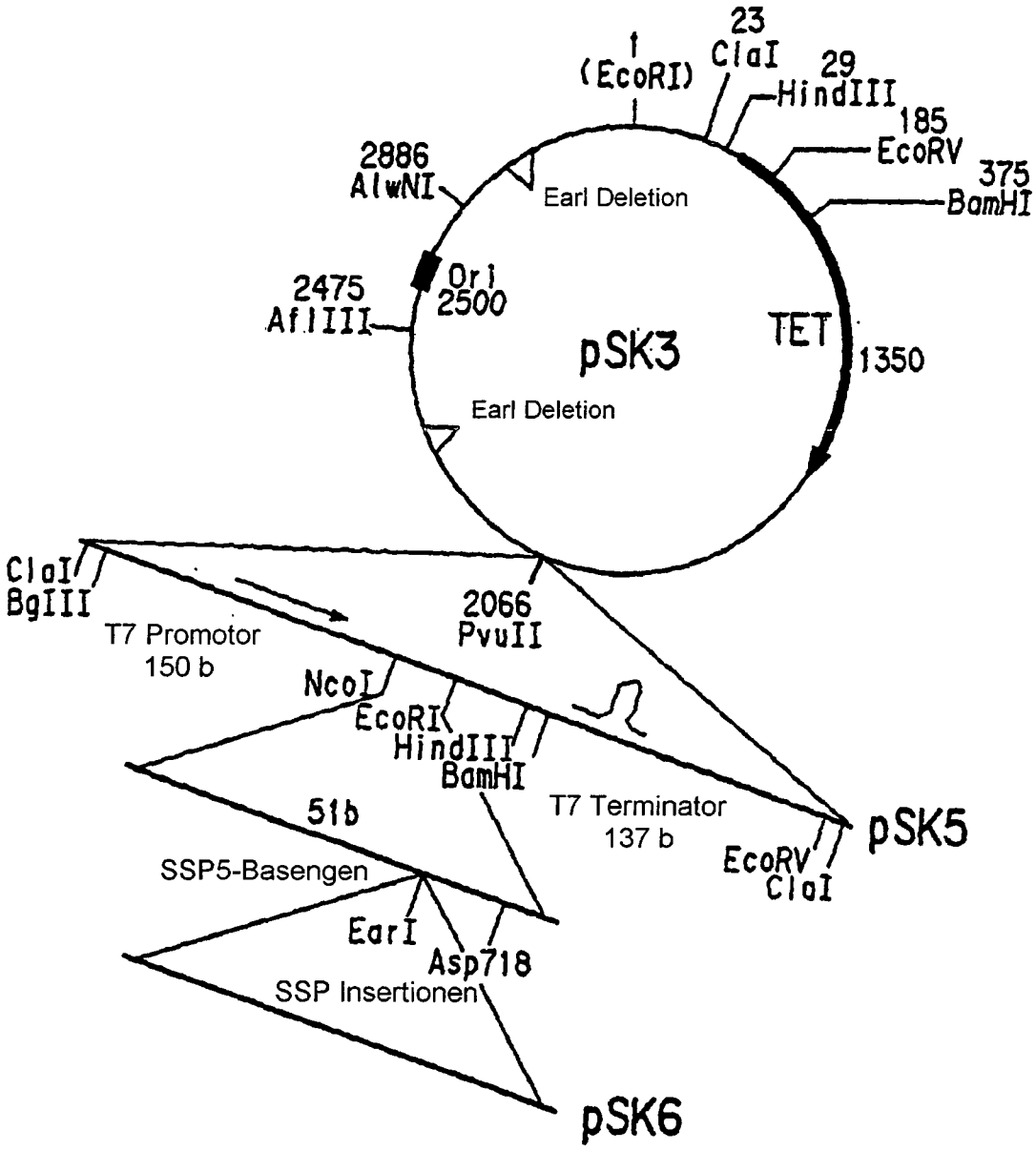
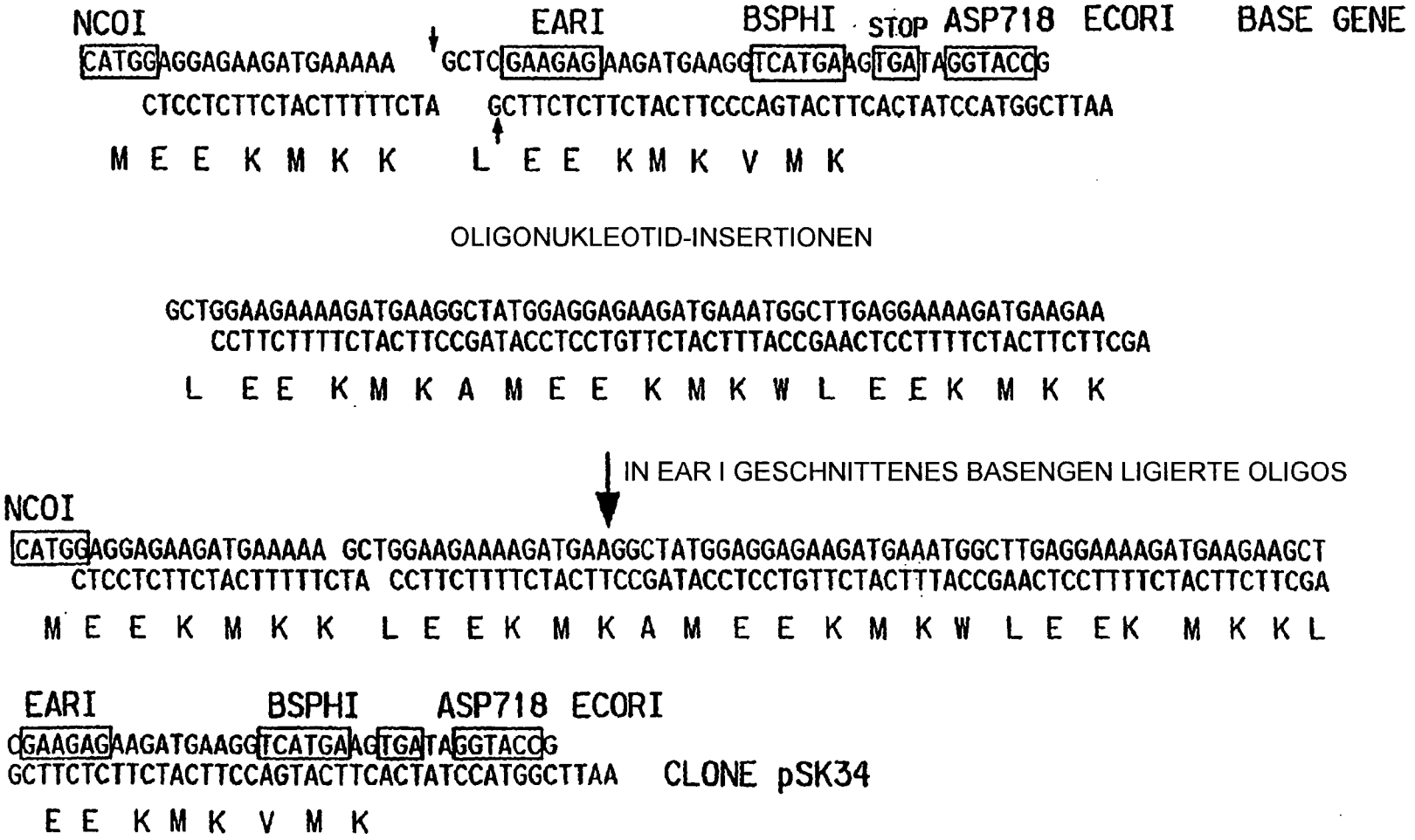

1
(EcoRI)
23
ClaI
29
HindIII
185
EcoRV
375
BamHI
2886
AlwNI
EarI Deletion
2475
AflIII
Ori
2500
pSK3
TET
1350
EarI Deletion
ClaI
BglII
T7 Promotor
150 b
2066
PvuII
NcoI
EcoRI
HindIII
BamHI
T7 Terminator
137 b
pSK5
EcoRV
ClaI
51b
SSP5-Basengen
EarI
Asp718
SSP Insertionen
pSK6

FIG.10



DE 694 34 786 T2 2007.06.14

FIG.11A

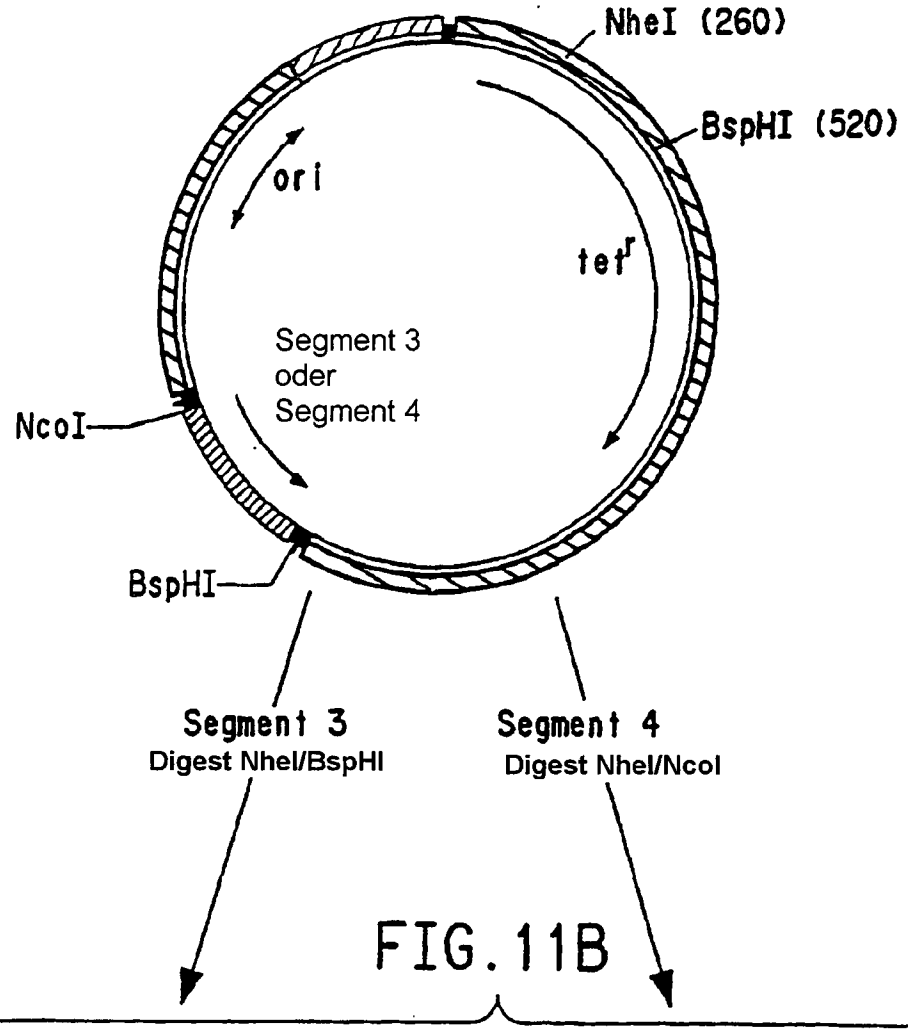


FIG.11B

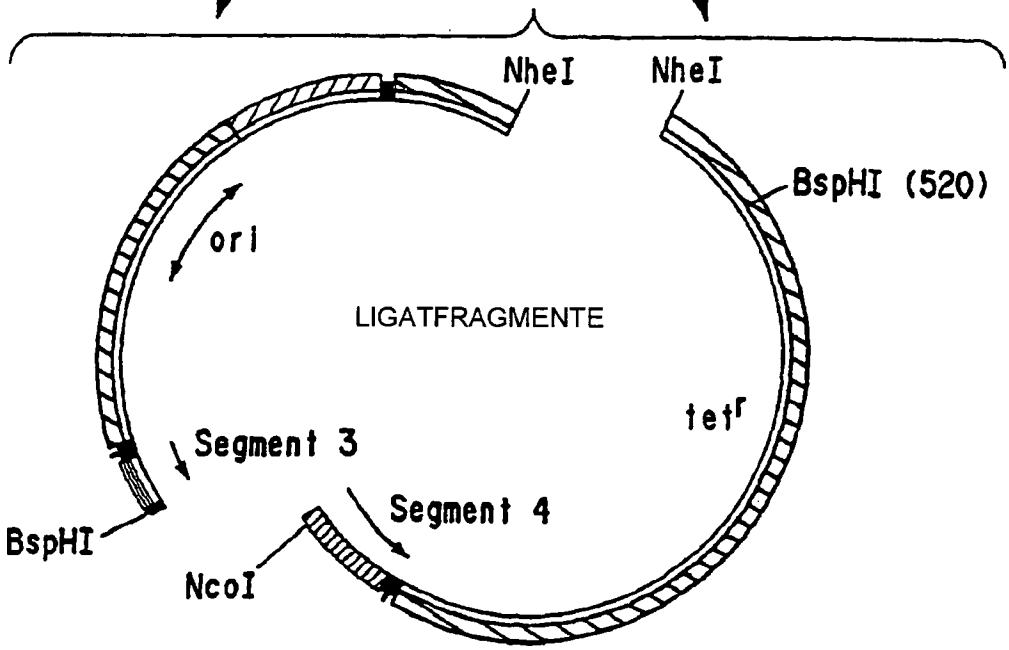


FIG.12

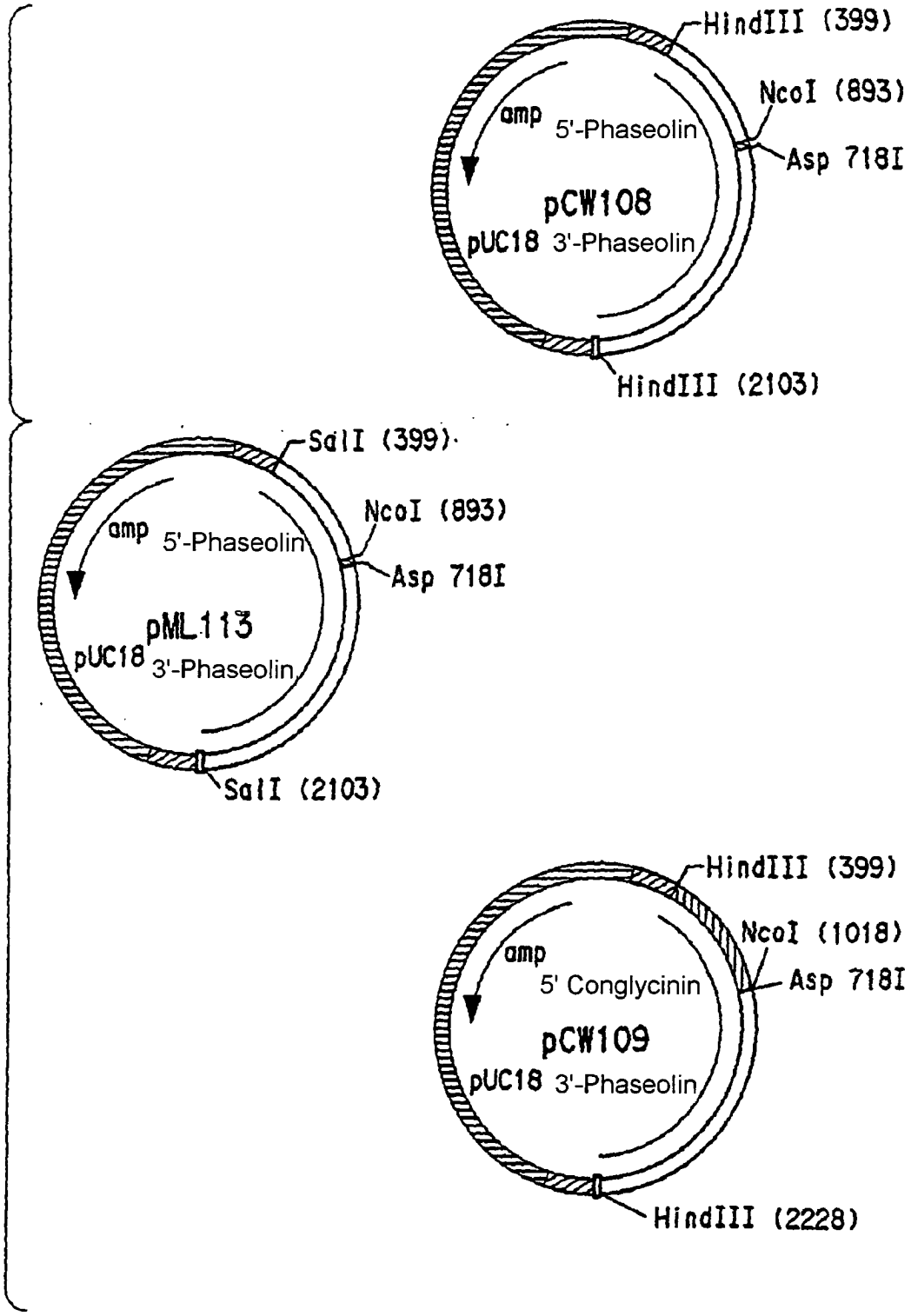

HindIII (399)
NcoI (893)
Asp 718I
amp
5'-Phaseolin
pCW108
pUC18
3'-Phaseolin
HindIII (2103)
SalI (399)
NcoI (893)
Asp 718I
amp
5'-Phaseolin
pML113
pUC18
3'-Phaseolin
SalI (2103)
HindIII (399)
NcoI (1018)
Asp 718I
amp
5' Conglycinin
pCW109
pUC18
3'-Phaseolin
HindIII (2228)

FIG. 13

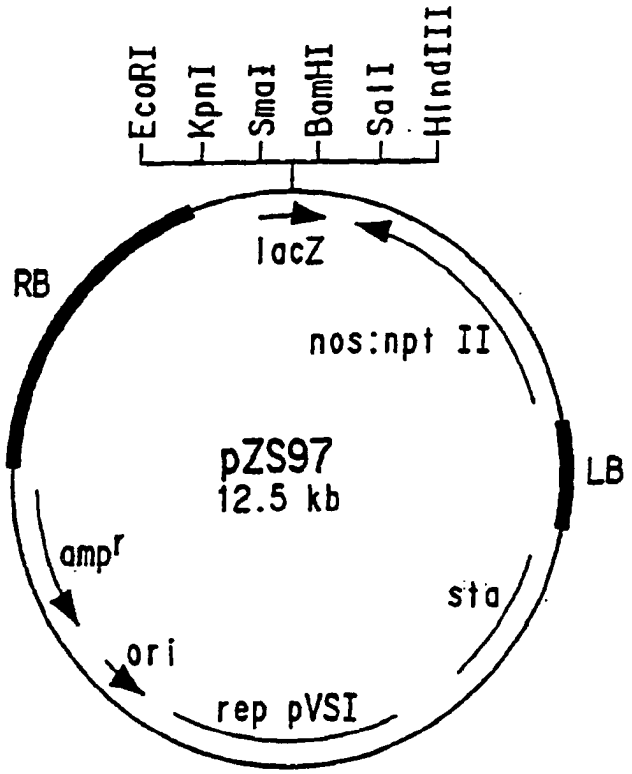
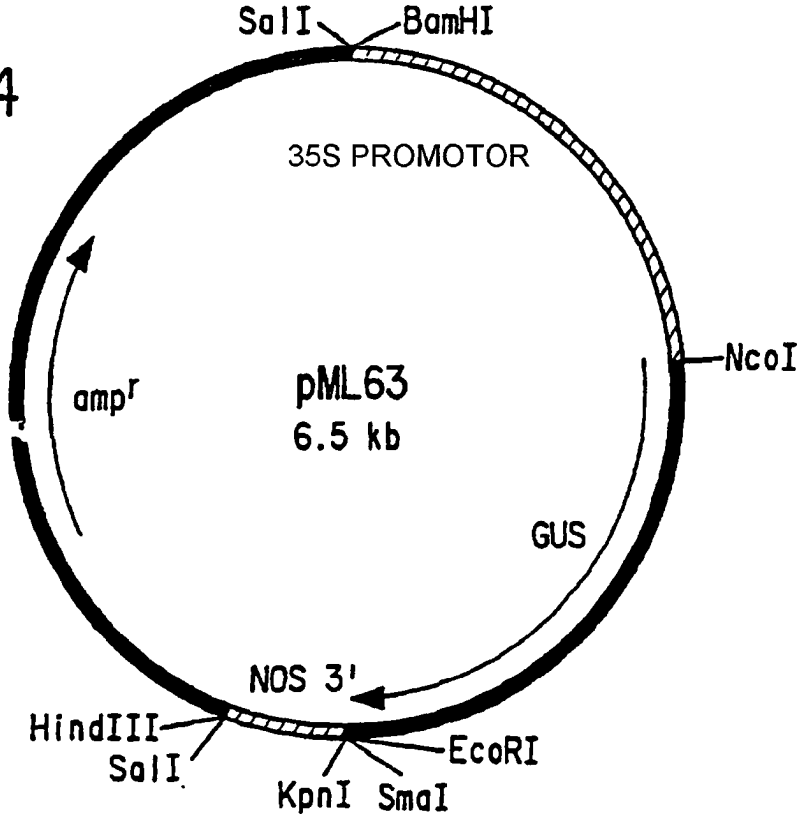
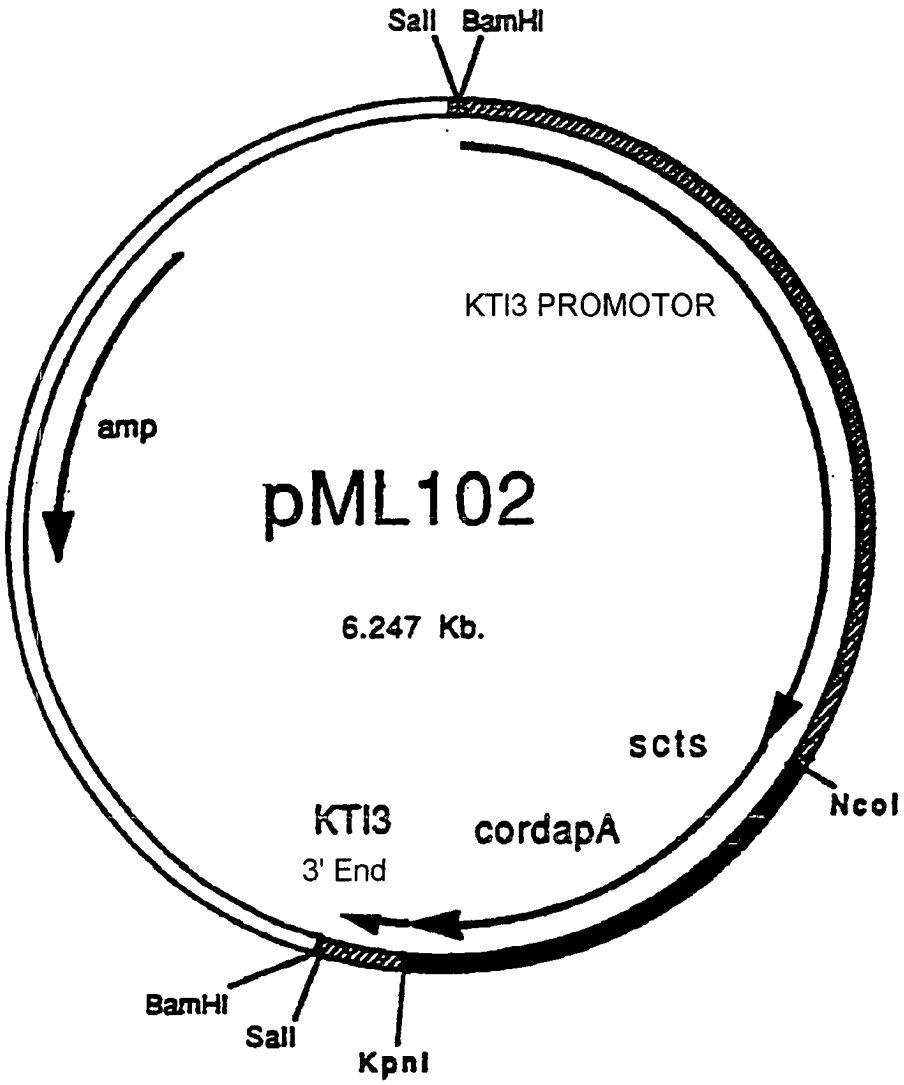

EcoRI
KpnI
SmaI
BamHI
SalI
HindIII
lacZ
RB
nos:npt II
pZS97
12.5 kb
LB
ampr
sta
ori
rep pVSI

FIG. 14


SalI
BamHI
35S PROMOTOR
NcoI
ampr
pML63
6.5 kb
GUS
NOS 3'
HindIII
SalI
KpnI
SmaI
EcoRI


SalI
BamHI
KTI3 PROMOTOR
amp
pML102
6.247 Kb.
scts
NcoI
KTI3
3' End
cordapA
BamHI
SalI
KpnI

FIGUR 15