



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 33 457 T2** 2006.09.14

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 032 680 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 33 457.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/24608**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 960 261.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/025840**

(86) PCT-Anmeldetag: **17.11.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **27.05.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **06.09.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **08.02.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.09.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/52** (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/90 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

A01H 5/10 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

65613 P **18.11.1997** **US**

65627 P **18.11.1997** **US**

99435 P **08.09.1998** **US**

(73) Patentinhaber:

**Pioneer Hi-Bred International, Inc., Des Moines,
Ia., US**

(74) Vertreter:

**Patent- und Rechtsanwälte Kraus & Weisert,
80539 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**BASZCZYNSKI, L., Christopher, Urbandale, IA
50322, US; LYZNIK, Alexander, Leszek, Johnston,
IA 50131, US; GORDON-KAMM, William J.,
Urbandale, IA 50322, US; RAO, Gururaj, Aragula,
Urbandale, IA 50322, US; TAGLIANI, A., Laura,
Zionsville, IN 46077, US; GUAN, Xueni, Chapel Hill,
NC 27514, US**

(54) Bezeichnung: **NEUARTIGE METHODE ZUR INTEGRATION VON FREMD-DNA INS EUKARYOTISCHE GENOM**

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

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

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die genetische Modifikation von Chromosomen. Es werden insbesondere Verfahren und Zusammensetzungen für die Integration von DNA in ein eukaryotisches Genom bereitgestellt.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Es wurden mehrere Ansätze verwendet, um eine DNA von Interesse in das Genom einer Pflanze zu integrieren. Im einfachsten Verfahren wird DNA in eine Zelle eingeführt und integriert durch illegitime Rekombination statistisch in das Genom. Ein Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, dass positionale Effekte durch statistische Integration es schwierig machen, eine Genexpression zu analysieren.

[0003] Als Alternative zur illegitimen Rekombination kann eine Integration auf eine besondere Stelle im Genom durch die Verwendung einer homologen Rekombination oder ortsspezifischen Rekombination targetiert werden. Bei Pflanzen, bei denen keine homologe Rekombinationstechnologie entwickelt wurde, wird eine ortsspezifische Rekombination verwendet, um eine Sequenz von Interesse in eine Integrationsstelle zu integrieren, die vorher in das Wirtspflanzengenom inseriert wurde. Wenn eine ortsspezifische Integration durch ein einfaches Kreuzungsereignis zwischen einem Chromosom und einem ringförmigen extrachromosomalen Replikon erfolgt, wird das gesamte Replikon in das Chromosom inseriert werden. Wenn eine Insertion des gesamten Replikons unerwünscht ist, kann ein Fragment des Replikons, das die DNA von Interesse umfasst, flankiert von Targetstellen für eine ortsspezifische Rekombinase, durch ein doppeltes reziprokes Kreuzungsereignis in ein Chromosom eingeführt werden, das eine Integrationsstelle hat, welche den Targetstellen entspricht, die die DNA von Interesse flankieren. In jedem Fall ist eine Integration ineffizient, da sie reversibel ist, d.h., die integrierte DNA kann durch anschließende ortsspezifische Rekombination zwischen den Targetstellen, die die integrierte DNA flankieren, ausgeschnitten werden.

[0004] Es wurden mehrere Ansätze unternommen, um eine Exzision bzw. ein Ausschneiden einer integrierten DNA zu vermeiden. In einem Ansatz wird die Expression einer ortsspezifischen Rekombinase, z.B. Cre oder FLP, zeitweise reguliert. Siehe O'Gorman et al. (1991) *Science* 251:1351-1355; Logie und Stewart (1995) *Proc Natl Acad Sci* 92:5940-5944; Zhang et al. (1996) *Nuc Acid Res* 24:543-548; Nichols et al. (1997) *Mol Endocrinol* 11:950-961; und Feil et al. (1997) *Biochem Biophys Res Comm* 237:752-757. In diesen Verfahren wird die Rekombinase entweder transient oder induzierbar kurz exprimiert, um eine Integration zuzulassen. Allerdings kann eine Exzision der integrierten DNA auftreten, bevor aktive Rekombinase aus der Zelle verschwindet. Darüber hinaus ist eine intramolekulare Exzision kinetisch gegenüber einer bimolekularen Integration begünstigt. Daher ist integrierte DNA in Gegenwart von Rekombinase von Natur aus instabil.

[0005] Ein zweiter Ansatz reduziert eine Exzision von integrierter DNA durch Verwendung von Paaren einzelner mutierten Zielstellen, sowohl auf dem Chromosom als auch der flankierenden DNA von Interesse. Siehe Albert et al. (1995) *Plant J* 7:649-659; Schlake und Bode (1994) *Biochemistry* 33:12746-12751; O'Gorman et al. (1997) *Proc Natl Acad Sci* 94:14602-14607; und Araki et al. (1997) *Nuc Acid Res* 25:868-872. Eine Rekombination zwischen einzelnen mutierten Zielstellen resultiert in doppelt mutierten Zielstellen, die die DNA flankieren, die in das Chromosom inseriert ist. Die doppelt mutierten Zielstellen werden durch die Rekombinase gut erkannt. So wird die inserierte DNA durch eine Umkehrreaktion nur bei niedrigen Leveln aus dem Chromosom ausgeschnitten. Dieses System hat allerdings den Nachteil, dass einzeln mutierte Zielstellen oft nicht als effiziente Rekombinationssubstrate wirken und somit die Integrationshäufigkeit reduziert ist. Außerdem sind Transformanten instabil, da eine Exzision noch erfolgen kann, wenn auch bei reduzierter Häufigkeit.

[0006] Ow et al. (1995), *Critical Reviews in Plant Sciences* 14(3), 239-261, offenbart mehrere ortsspezifische Rekombinationssysteme, von denen gezeigt wurde, dass sie in höheren eukaryotischen Zellen arbeiten. Diese Zwei-Komponentensysteme bestehen aus einer Einzel-Polypeptid-Rekombinase und einer kurzen Erkennungssequenz mit weniger als 35 bp.

[0007] Dementsprechend besteht eine Aufgabe der Erfindung in der Bereitstellung von effizienten Methoden für eine ortsspezifische Integration von DNA in eukaryotische Genome, die anschließende Exzisionsreaktionen und andere nicht-produktive Rekombinationsreaktionen vermeiden.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0008] Es werden Zusammensetzungen und Verfahren zum Einführen einer DNA von Interesse in eine geno-

mische Integrationsstelle bereitgestellt. Die Verfahren und Zusammensetzungen involvieren insbesondere die Verwendung einer Kombination von Targetstellen bzw. Zielstellen für zwei unterschiedliche ortsspezifische Rekombinasen, z.B. Cre und FLP, und Expression einer chimären Rekombinase mit dualer Targetstellenspezifität. Somit umfassen die Kombinationen neue ortsspezifische Rekombinasen mit Spezifitäten für multiple Targetstellen und Nucleotidsequenzen und Expressionskassetten, die für diese Rekombinasen oder Targetstellen codieren. Die Verfahren involvieren Transformieren einer eukaryotischen Zelle mit Targetstellen für die neue Rekombinase mit einer DNA von Interesse, die durch entsprechende Targetstellen flankiert ist. Die Expression entweder der neuen chimären Rekombinase oder von zwei ortsspezifischen Rekombinasen in der eukaryotischen Zelle resultiert in der Integration der DNA von Interesse in das Genom. Die Zusammensetzungen und Verfahren der Erfindung haben eine Verwendung bei der Konstruktion von stabil transformierten eukaryotischen Zellen, und insbesondere Pflanzenzellen. Die Verfahren resultieren in einer effizienten targetierten genomischen Integration von DNA durch ortsspezifische Rekombination.

[0009] Erfindungsgemäß wird demnach ein rekombinantes Protein bereitgestellt, umfassend eine erste ortsspezifische Rekombinase, im Raster fusioniert mit einer zweiten unterschiedlichen ortsspezifischen Rekombinase.

[0010] Die Erfindung stellt auch bereit:

- ein rekombinantes Protein, das die Aminosäuresequenz umfasst, die aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus SEQ ID NO: 3, 6, 9 und 11;
- ein Nucleinsäuremolekül, das eine Nucleotidsequenz, die für eine erste ortsspezifische Rekombinase, im Raster fusioniert mit einer zweiten unterschiedlichen ortsspezifischen Rekombinase, codiert, umfasst;
- ein Nucleinsäuremolekül, das SEQ ID NO: 2, 4, 5, 7 oder 8 umfasst;
- eine eukaryotische Zelle, die ein Nucleinsäuremolekül der Erfindung stabil in ihr Genom eingebaut hat;
- eine Pflanze, die in ein Chromosom wenigstens eine Integrationsstelle, die eine Targetstelle für eine erste ortsspezifische Rekombinase und eine Targetstelle für eine zweite unterschiedliche ortsspezifische Rekombinase umfasst, stabil integriert hat, wobei die Targetstellen aneinander angrenzend sind;
- eine Pflanze, die stabil in ihr Genom ein Nucleinsäuremolekül der Erfindung integriert hat;
- ein Verfahren zum Integrieren einer DNA von Interesse in das Genom einer eukaryotischen Zelle, umfassend:
 - (a) Einführen einer Transferkassette, die die DNA von Interesse umfasst, in die eukaryotische Zelle, wobei die DNA von Interesse von einer Targetstelle für eine erste ortsspezifische Rekombinase und einer Targetstelle für eine zweite unterschiedliche ortsspezifische Rekombinase flankiert wird und das Genom der eukaryotischen Zelle wenigstens eine Integrationsstelle umfasst, die die Targetstellen umfasst, welche den Targetstellen entsprechen, die die DNA von Interesse flankieren; und
 - (b) Bereitstellen in der genannten eukaryotischen Zelle eines rekombinanten Proteins, das die erste Rekombinase, ein aktives Derivat der ersten Rekombinase oder ein aktives Fragment der ersten Rekombinase, im Raster fusioniert mit der zweiten unterschiedlichen Rekombinase, einem aktiven Derivat der zweiten unterschiedlichen Rekombinase oder einem aktiven Fragment der zweiten unterschiedlichen Rekombinase umfasst, wobei die erste und die zweite Rekombinase, das aktive Derivat oder das aktive Fragment ein konservatives ortsspezifisches Rekombinationsereignis katalysieren, wobei die DNA von Interesse an der Integrationsstelle in das Genom integriert wird;
- ein Verfahren zum Integrieren einer DNA von Interesse in das Genom einer eukaryotischen Zelle, umfassend:
 - (a) Einführen einer Transferkassette, die die DNA von Interesse umfasst, in die eukaryotische Zelle, wobei die DNA von Interesse durch eine Targetstelle für eine erste ortsspezifische Rekombinase und eine Targetstelle für eine zweite unterschiedliche ortsspezifische Rekombinase flankiert wird und das Genom der eukaryotischen Zelle wenigstens eine Integrationsstelle umfasst, die die Targetstellen umfasst, die den Targetstellen entsprechen, welche die DNA von Interesse flankieren; und
 - (b) Bereitstellen in der Zelle der ersten Rekombinase eines aktiven Derivats der ersten Rekombinase oder eines aktiven Fragments der ersten Rekombinase; und der zweiten unterschiedlichen Rekombinase, eines aktiven Derivats der zweiten Rekombinase oder eines aktiven Derivats der zweiten unterschiedlichen Rekombinase, wobei die erste und zweite Rekombinase, das aktive Derivat oder das aktive Fragment ein konservatives ortsspezifisches Rekombinationsereignis katalysieren; und
- transformierten Samen aus einer Pflanze der Erfindung.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0011] [Fig. 1](#) stellt schematisch Pflanzentransformationsvektoren, PHP 13164 und PHP 13147, zur Expression von moCRE-Rekombinase bzw. Cre:FLPm-Rekombinase dar.

[0012] [Fig. 2](#) stellt die Aktivierung der GUS-Expression durch FLPm- oder CRE:FLPm-vermittelte Exzision einer Sequenz, die durch FRT-Stellen flankiert wird, die einen Ubiquitin-Promotor und das GUS-offene Leseraster trennt, dar.

[0013] [Fig. 3](#) stellt graphisch die Aktivierung der GUS-Expression durch CRE:FLPm-vermittelte Exzision einer Sequenz, die durch loxP-Stellen flankiert wird, die den Ubiquitin-Promotor und das GUS-offene Leseraster trennt, dar.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0014] Zusammensetzungen und Verfahren zur ortsspezifischen Integration von DNA in vorher festgelegte genomische Integrationsstellen in einem Wirtsgenom werden bereitgestellt. Die Erfindung sorgt für die Verwendung von chimären Rekombinasen, die eine ortsspezifische Rekombination zwischen Zielstellen katalysieren, welche aus unterschiedlichen ortsspezifischen Rekombinationssystemen stammen. Eine derartige chimäre Rekombinase mit dualer Funktion stellt sicher, dass die zwei Enden von Fremd-DNA nicht miteinander ligieren, sondern mit ihren verwandten Partner-Targetstellen, die in der genomischen DNA liegen, rekombinieren. Die Verfahren erleichtern das Richtungstargeting von gewünschten Genen und Nucleotidsequenzen in entsprechende Integrationsstellen, die vorher in das Genom eingeführt wurden.

[0015] In den Verfahren der Erfindung wird eine Kombination von Targetstellen für zwei ortsspezifische Rekombinasen in das Genom eines Organismus von Interesse eingeführt, was eine Integrationsstelle zu Insertion einer Nucleotidsequenz von Interesse einrichtet. Zu Zwecken der Erfindung wird eine Integrationsstelle flankierende Targetstellen umfassen, wobei die Targetstellen den Rekombinationsstellen für zwei unterschiedliche ortsspezifische Rekombinasen entsprechen. Diese Rekombinations- oder Targetstellen können andere Nucleotidsequenzen flankieren oder können fortlaufend sein. Verfahren für die Erzeugung von transgenen Pflanzen, die spezifische Rekombinationsstellen in das Pflanzengenom integriert enthalten, sind in der gleichzeitig abhängigen vorläufigen Anmeldung, Serial No. 60/065 627 mit dem Titel "Compositions and Methods for Genetic Modification of Plants", eingereicht am 18. November 1997, beschrieben, die hier durch Referenz aufgenommen wird. Sobald eine stabile Pflanze oder ein stabiles Kulturgewebe entwickelt ist, wird eine Transferkassette, die eine DNA von Interesse flankiert von Targetstellen, die denen der genomischen Integrationsstelle entsprechen, umfasst, in die stabil transformierte Pflanze oder die stabil transformierten Gewebe in Gegenwart einer chimären Rekombinase mit Spezifitäten für jede der Targetstellen eingeführt. Alternativ können zwei unterschiedliche Rekombinasen, die den Targetstellen entsprechen, anstelle einer chimären Rekombinase in der Zelle vorliegen. Dieses Verfahren resultiert im Austausch der Nucleotidsequenzen zwischen den zwei identischen Targetstellen der genomischen Integrationsstelle und der Transferkassette.

[0016] Somit stellt die Erfindung ein Verfahren zum Integrieren einer DNA von Interesse in das Genom einer eukaryotischen Zelle bereit, umfassend:

- a) Transformieren der Zelle mit einer Transferkassette, die die DNA umfasst, wobei die DNA durch eine Targetstelle für eine erste ortsspezifische Rekombinase und eine Targetstelle für eine zweite ortsspezifische Rekombinase flankiert wird und das Genom eine Integrationsstelle enthält, welche Targetstellen umfasst, die den Targetstellen entsprechen, welche die DNA flankieren; und
- b) Bereitstellen in der Zelle eines rekombinanten Proteins, das die erste Rekombinase im Raster fusioniert mit der zweiten Rekombinase umfasst.

[0017] Die Erfindung stellt außerdem ein Verfahren zum Integrieren einer DNA von Interesse in das Genom einer eukaryotischen Zelle bereit, umfassend:

- a) Transformieren der Zelle mit einer Transferkassette, die die DNA umfasst, wobei die DNA durch eine Targetstelle für eine erste ortsspezifische Rekombinase und eine Targetstelle für eine zweite ortsspezifische Rekombinase flankiert wird und das Genom eine Integrationsstelle enthält, die Targetstellen umfasst, die den Targetstellen entsprechen, die die DNA flankieren; und
- b) Bereitstellen in der Zelle die erste Rekombinase und die zweite Rekombinase.

[0018] Mit "ortsspezifische Rekombinase" ist ein beliebiges Enzym gemeint, das eine konservative ortsspezifische Rekombination zwischen seinen entsprechenden Rekombinationsstellen katalysiert. Bezüglich einer Übersicht über ortsspezifische Rekombinasen siehe Sauer (1994) *Current Opinion in Biotechnology* 5:521-527; und Sadowski (1993) *FASEB* 7:760-767.

[0019] Die erste und zweite ortsspezifische Rekombinase können Vollängen-Rekombinasen und/oder aktive Fragmente oder Derivate davon sein. Ortsspezifische Rekombinasen, die zur Erzeugung der chimären Re-

kombinasen der Erfindung einsetzbar sind, umfassen Rekombinasen aus der Integrase-Familie, Derivate davon oder ein beliebiges anderes natürlich vorkommendes oder rekombinant produziertes Enzym oder Derivat davon, das eine konservative ortsspezifische Rekombination zwischen spezifizierten DNA-Stellen katalysiert. Die Integrase-Familie von Rekombinasen hat über dreißig Mitglieder und umfasst FLP, Cre, Int und R. Vorzugsweise benötigen die Rekombinasen keine Cofaktoren oder kein "supercoiled" Substrat. Am meisten bevorzugt sind die Rekombinasen Cre und FLP. Die Bakteriophage P1 loxP-Cre- und die Saccharomyces 2 μ -Plasmid FRT/FLP-ortsspezifischen Rekombinationssysteme wurden umfangreich untersucht, und ihre Verwendungen sind dem Fachmann gut bekannt. Von Cre und FLP ist bekannt, dass sie in einer Vielzahl von Organismen einschließlich Bakterien, Hefe, Drosophila, Säugern und monokotylen und dikotylen Pflanzen funktionieren. Außerdem erfordern diese Rekombinasen keine Hilfsfaktoren, um zu funktionieren.

[0020] Die ortsspezifischen Rekombinasen und Sequenzen, die diese codieren, die in den Verfahren und den Zusammensetzungen der Erfindung eingesetzt werden können, können Varianten natürlich auftretender Rekombinasen und die Gene, die diese codieren, sein. Der Ausdruck "konservativ modifizierte Varianten" findet sowohl auf Aminosäure- wie auch auf Nucleinsäuresequenzen Anwendung. Bezüglich bestimmter Nucleinsäuresequenzen beziehen sich konservativ modifizierte Varianten auf solche Nucleinsäuren, die identische oder konservativ modifizierte Varianten der Aminosäuresequenzen codieren. Infolge der Degeneriertheit des genetischen Codes codiert eine ganze Reihe von funktionell identischen Nucleinsäuren für ein gegebenes Protein. Beispielsweise codieren die Codons GCA, GCC, GCG und GCU alle für die Aminosäure Alanin. So kann das Codon an jeder Position, in der ein Alanin durch ein Codon spezifiziert ist, in ein beliebiges der entsprechenden Codons, die beschrieben wurden, geändert werden, ohne dass das codierte Polypeptid verändert wird. Solche Nucleinsäurevariationen sind "stille Variationen" und stellen eine Spezies konservativ modifizierter Variation dar. Ein Fachmann wird erkennen, dass jedes Codon in einer Nucleinsäure (außer AUG, das normalerweise das einzige Codon für Methionin ist) modifiziert werden kann, um ein funktionell identisches Molekül zu liefern.

[0021] Was die Aminosäuresequenzen angeht, so wird ein Fachmann erkennen, dass einzelne Substitutionen, Deletionen oder Additionen an eine Nucleinsäure-, Peptid-, Polypeptid- oder Proteinsequenz, die eine einzelne Aminosäure oder einen geringen Prozentsatz an Aminosäuren in der codierten Sequenz ändern, addieren oder deletieren, eine "konservativ modifizierte Variante" ist, in der die Veränderung in der Substitution einer Aminosäure durch eine chemisch ähnliche Aminosäure resultiert. Somit kann eine beliebige Zahl an Aminosäureresten, ausgewählt aus der Gruppe von ganzen Zahlen, bestehend aus 1 bis 15, verändert werden. Beispielsweise können so 1, 2, 3, 4, 5, 7 oder 10 Veränderungen durchgeführt werden. Konservativ modifizierte Varianten stellen typischerweise ähnliche biologische Aktivität, wie die nicht-modifizierte Polypeptidsequenz, aus der sie abgeleitet sind, bereit. Z.B. ist die Substratspezifität, Enzymaktivität oder Ligand/Rezeptor-Bindung im Allgemeinen wenigstens 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% oder 90% derjenigen des nativen Proteins für sein natives Substrat. Konservative Substitutionstabellen, die funktionell ähnliche Aminosäuren bereitstellen, sind auf dem Fachgebiet gut bekannt.

[0022] Die folgenden sechs Gruppen enthalten jeweils Aminosäuren, die konservative Substitutionen füreinander sind:

- 1) Alanin (A), Serin (S), Theronin (T);
- 2) Asparaginsäure (D), Glutaminsäure (E);
- 3) Asparagin (N), Glutamin (Q);
- 4) Arginin (R), Lysin (K);
- 5) Isoleucin (I), Leucin (L), Methionin (M), Valin (V); und
- 6) Phenylalanin (F), Tyrosin (Y), Tryptophan (W).

Siehe Creighton (1984) Proteins, W.H. Freeman und Company.

[0023] Anstelle einer Verwendung von Vollängen-Rekombinasen können funktionelle Fragmente von ortsspezifischen Rekombinasen in den Verfahren und Zusammensetzungen der Erfindung verwendet werden. Funktionelle Fragmente von ortsspezifischen Rekombinasen können unter Verwendung einer Vielzahl von Techniken identifiziert werden. Beispielsweise können funktionelle Fragmente des FLP-Proteins durch ihre Fähigkeit, bei Einführung in Zellen, die geeignete FRT-Substrate enthalten, eine ortsspezifische Rekombination zu katalysieren und in der Exzision eines analysierbaren Markergens zu resultieren, identifiziert werden.

[0024] Ein allgemeiner Ansatz für eine derartige funktionelle Analyse involviert eine Subklonierung von DNA-Fragmenten eines genomischen Klons, cDNA-Klons oder einer synthetisierten Gensequenz in einen Expressionsvektor, Einführen des Expressionsvektors in einen heterologen Wirt und Screening, um das Rekombinationsprodukt zu detektieren (d.h., unter Verwendung einer Restriktionsanalyse, um das Rekombinations-

produkt auf dem Nucleinsäurelevel zu bestätigen, oder auf der Basis eines Assaysystems für eine Rekombination, wie es oben beschrieben wurde). Methoden zur Erzeugung von Fragmenten einer cDNA oder eines genomischen Klon sind gut bekannt. Varianten einer isolierten DNA, die für eine ortsspezifische Rekombinase codiert, können durch Deletieren, Addieren und/oder Substituieren von Nucleotiden produziert werden. Solche Varianten können z.B. durch Oligonucleotid-gerichtete Mutagenese, Linker-Scanning-Mutagenese, Mutagenese unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion und dergleichen erhalten werden. Siehe z.B. Ausubel, *Current Protocols In Molecular Biology*, Wiley Interscience (1990), Seiten 8.0.3 – 8.5.9, und McPherson (Herausg.), *Directed Mutagenesis: A Practical Approach*, (IRL Press, 1991).

[0025] Die rekombinanten Proteine der Erfindung mit dualer Funktion umfassen eine erste ortsspezifische Rekombinase im Raster, fusioniert mit einer zweiten ortsspezifischen Rekombinase. Es wird erkannt werden, dass die Rekombinasen in den Verfahren der Erfindung, die der chimären Rekombinase entsprechen, den Targetstellen des transformierten Organismus und der Targetingkassette entsprechen müssen. D.h., wenn FRT- und loxP-Stellen verwendet werden, wird eine chimäre FLP:Cre-Rekombinase benötigt werden.

[0026] Die offenen Leseraster, die für die ersten und zweiten Rekombinasen codieren, können direkt miteinander fusioniert sein oder können durch einen Linker verknüpft sein, der das korrekte Leseraster der chimären Rekombinase aufrechterhält. Es ist klar, dass die Rekombinasen Amino-an-Carboxy-Terminus, Amino-an-Amino-Terminus oder Carboxy-an-Amino-Terminus fusioniert sein können.

[0027] Gene, die für chimäre ortsspezifische Rekmobinasen und Rekombinationsstellen codieren, können unter Verwendung von Standard-Rekombinationsverfahren, Synthesetechniken oder Kombinationen davon hergestellt werden. Die Verwendung von Klonierungsvektoren, Expressionsvektoren, Adaptoren und Linkern ist auf dem Fachgebiet gut bekannt und kann in Literaturstellen, wie z.B. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Ausg. (Cold Spring Harbor, New York, 1989) gefunden werden. Es ist eine Vielzahl von Strategien zum Ligieren von DNA-Fragmenten verfügbar, deren Wahl von der Natur der Termini der DNA-Fragmente abhängt, wobei diese Wahl in einfacher Weise von einem Fachmann vorgenommen werden kann. Das FLP-Rekombinase-Gen aus Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) ist im Handel im Plasmid pOG44 von Stratagene Cloning Systems (11011 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037) verfügbar. Bezüglich einer Beschreibung des FLP-Gens und verschiedener Nucleinsäuren siehe z.B. *Stratagene Cloning Systems*, Kataloge 1995, 1996, 1997 (La Jolla, CA); und Amersham Life Sciences, Inc., Katalog '97 (Arlington Heights, IL). In ähnlicher Weise sind die Sequenzen von vielen anderen ortsspezifischen Rekombinasen und ihren verwandten Erkennungsstellen allgemein oder kommerziell verfügbar. Gene, die für FLP und Cre codieren, können auch z.B. durch Synthetisieren der Gene mit wechselseitigem Priming langer Oligonucleotide erhalten werden. Siehe z.B. Ausubel et al. (Hrsg.), *Current Protocols in Molecular Biology*, Seiten 8.2.8 bis 8.2.13, Wiley Interscience (1990). Siehe auch Wosniak et al. (1987) *Gene* 60:115. Darüber hinaus bieten derzeitige Techniken unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion die Fähigkeit, Gene zu synthetisieren, die in der Länge so groß wie 1,8 Kilobasen sind (Adang et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* 21:1131; Bombat et al. (1993) *PCR Methods and Applications* 2:266).

[0028] Wenn die Nucleinsäure synthetisch hergestellt oder verändert wird, können bekannte Codonpräferenzen des vorgesehenen Wirts, in dem die Nucleinsäure exprimiert werden soll, genutzt werden. Obgleich z.B. Nucleinsäuresequenzen der vorliegenden Erfindung sowohl in monokotylen wie auch in dikotylen Pflanzenspezies exprimiert werden können, können Sequenzen modifiziert werden, um für spezifische Codonpräferenzen und GC-Gehaltspräferenzen von Monokotylen oder Dikotylen verantwortlich zu sein, da gezeigt wurde, dass diese Differenzen differieren (Murray et al. (1989) *Nucl. Acids Res.* 17:477-498; und Campbell et al. (1990) *Plant Physiol.* 92:1). So kann das in Mais bevorzugte Codon für eine bestimmte Aminosäure aus bekannten Gensequenzen aus Mais abgeleitet werden. Eine Maiscodonverwendung für 28 Gene aus Maispflanzen ist in Tabelle 4 von Murray et al., supra, aufgelistet.

[0029] Beispiele für Gene, die für Rekombinasen codieren, die in Mais bevorzugte Codons verwenden, umfassen FLPm, das in der gleichzeitig anhängigen Anmeldung 08/972 258 beschrieben wird, deren Inhalt hier durch Bezugnahme aufgenommen wird, und moCre, das in SEQ ID NO: 1 und 2 gezeigt wird. FLPm stammt aus der *Saccharomyces-2μ-Plasmid-FLP-Rekombinase*, wird aber durch eine Nucleinsäuresequenz codiert, die in Mais bevorzugte Codons verwendet. Obgleich die FLPm-Nucleinsäuresequenz bevorzugte Codons für eine Expression von Aminosäuren in Mais enthält, ist einzusehen, dass eine nützliche Sequenz Codons enthalten kann, die in Mais mit weniger als den höchsten beschriebenen Mais-Codon-Häufigkeiten auftreten. Beispiele für Nucleinsäuren, die für chimäre Rekombinasen codieren, umfassen Cre:FLPm (SEQ. ID NO: 4), moCre:FLPm (SEQ. ID NO: 5), Cre:FLP (SEQ. ID NO: 7) und FLPm:Cre (SEQ. ID NO: 8).

[0030] Die Erfindung stellt auch Expressionskassetten bereit, die eine Nucleinsäuresequenz enthalten, welche für eine chimäre ortsspezifische Rekombinase codiert, funktionell verknüpft mit einem Promotor, der eine Expression in einer eukaryotischen Zelle steuert. Vorzugsweise ist der Promotor ein Pflanzenpromotor. Beispielsweise enthält der Pflanzenexpressionsvektor PHP13147, der in [Fig. 1](#) gezeigt ist, eine Expressionskassette für Cre:FLPm, worin das Gen, das für die chimäre Rekombinase codiert, funktionell mit einem Ubiquitin-Promotor verknüpft ist. Der Ausdruck "funktionell verknüpft", wie er hier verwendet wird, umfasst die Bezugnahme auf eine funktionelle Verknüpfung zwischen einem Promotor und einer zweiten Sequenz, wobei die Promotorsequenz eine Transkription der DNA-Sequenz, die der zweiten Sequenz entspricht, initiiert und vermittelt. Im Allgemeinen bedeutet funktionell verknüpft, dass die Nucleinsäuresequenzen, die verknüpft sind, fortlaufend sind und, wo es notwendig ist, zwei für Protein codierende Regionen verknüpfen, die kontinuierlich und im selben Leseraster sind.

[0031] Der Ausdruck "Promotor", wie er hier verwendet wird, beinhaltet die Bezugnahme auf eine DNA-Region stromaufwärts vom Transkriptionsstart und involviert bei der Erkennung und Bindung von RNA-Polymerase und anderen Proteinen unter Initiierung einer Transkription. Ein "Pflanzen-Promotor" ist ein Promotor, der fähig ist, eine Transkription in Pflanzenzellen zu initiieren. Beispiele für Pflanzen-Promotoren umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, jene, die aus Pflanzen, Pflanzenviren und Bakterien-Genen, die in Pflanzenzellen exprimiert werden, z.B. die von Agrobacterium oder Rhizobium, erhalten werden. Sowohl heterologe als auch nicht-heterologe (d.h. endogene) Promotoren können verwendet werden, um die Expression einer Sequenz, die für eine ortsspezifische Rekombinase codiert, zu steuern. Der Promotor kann konstitutiv, induzierbar oder gewebespezifisch sein.

[0032] In der vorliegenden Erfindung können viele verschiedene konstitutive Promotoren eingesetzt werden. Beispiele für konstitutive Promotoren umfassen die Promotoren aus Pflanzenviren, z.B. der 35S-Promotor aus CaMV (Odell et al. (1985) Nature 313:810-812) und die Promotoren aus solchen Genen, wie Reisaktin (McElroy et al. (1990) Plant Cell 2:163-171); Ubiquitin (Christensen et al. (1989) Plant Mol. Biol. 12:619-632 und Christensen et al. (1992) Plant Mol. Biol. 18:675-689); pEMU (Last et al. (1991) Theor. Appl. Genet. 81:581-588); MAS (Velten et al. (1984) EMBO J. 3:2723-2730); Mais-H3-Histon (Lepetit et al. (1992) Mol. Gen. Genet. 231:276-285 und Atanassova et al. (1992) Plant Journal 2(3):291-300); der 1'- oder 2'-Promotor, der aus der T-DNA von Agrobacterium tumefaciens stammt, der Smas-Promotor, der Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US-Patent Nr. 5 683 439), der Nos-Promotor, der Pemu-Promotor, der Rubisco-Promotor, der GRP1-8-Promotor, und andere Transkriptions-Initiationsregionen aus verschiedenen Pflanzengenen, die dem Fachmann bekannt sind. Der ALS-Promotor, ein XbaI/NcoI-Fragment 5-Primer zu dem Brassica napus-ALS3-Strukturgen (oder einer Nucleotidsequenz, die wesentliche Sequenzsimilarität zu dem XbaI/NcoI-Fragment hat) stellt einen besonders nützlichen konstitutiven Promotor dar (siehe die anhängige Pioneer Hi-Bred International-US-Patentanmeldung 08/409 297 und das entsprechende US-Patent Nr. 5 659 026, veröffentlicht am 19. August 1997).

[0033] Eine Vielzahl von induzierbaren Promotoren kann in der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden. Siehe Ward et al. (1993) Plant Mol. Biol. 22:361-366. Beispiele für induzierbare Promotoren umfassen den aus dem ACE1-System, der auf Kupfer anspricht (Mett et al. (1993) PNAS 90:4567-4571); In2-Gen aus Mais, das auf Benzolsulfonamid-Herbizid-Gegenmittel anspricht (Hershey et al. (1991) Mol. Gen. Genetics 227:229-237 und Gatz et al. (1994) Mol. Gen. Genetics 243:32-38); der Adh1-Promotor, der durch Hypoxie oder Kältestress induzierbar ist, der Hsp70-Promotor, der durch Hitzestress induzierbar ist, und der PPDK-Promotor, der durch Licht induzierbar ist, oder Tet-Repressor aus Tn10 (Gatz et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 227-237). Ein besonders bevorzugter induzierbarer Promotor ist ein Promotor, der auf ein induzierendes Mittel anspricht, auf das Pflanzen normalerweise nicht ansprechen. Ein Beispiel für einen induzierbaren Promotor ist ein induzierbarer Promotor aus einem Steroidhormon-Gen, dessen Transkriptionsaktivität durch ein Glucocorticosteroidhormon induziert wird (Schena et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:10421).

[0034] Beispiele für Promotoren unter Entwicklungskontrolle umfassen Promotoren, die eine Transkription nur oder vorzugsweise in bestimmten Geweben, z.B. Blättern, Wurzeln, Früchten, Samen oder Blumen, initiieren. Die Funktion eines Promotors kann auch in Abhängigkeit von seiner Lage im Genom variieren. So kann ein induzierbarer Promotor an bestimmten Stellen vollständig oder partiell konstitutiv werden.

[0035] Die chimäre Rekombinase muss für eine Integration der DNA von Interesse in das Wirtsgenom in der Pflanze exprimiert werden. Dementsprechend kann die Expressionskassette, die für die ortsspezifische Rekombinase codiert, in cis der DNA von Interesse; in trans an einem Wirtschromosom oder extrachromosomalen Replikon zugeführt werden oder kann in den Wirt transferiert werden und transient in der Nähe des Zeitpunkts, an dem eine Rekombination gewünscht wird, exprimiert werden.

[0036] Die Zusammensetzungen der Erfindung umfassen Transferkassetten, die Nucleotidsequenzen umfassen, welche für die chimären Rekombinasen der Erfindung codieren. Mit Transferkassette ist jede Nucleotidsequenz gemeint, die verwendet werden kann, um eine Zelle von Interesse zu transformieren. Beispielsweise kann die Transferkassette ein unabhängiges Replikon, z.B. ein Plasmid, Shuttlevektor, Ti-Plasmid, viraler Vektor oder dergleichen, sein. Alternativ könnte die Transferkassette eine Nucleinsäure sein, die nicht zur unabhängigen Replikation fähig ist, jedoch in einen Organismus von Interesse durch eine Vielzahl von Transformationsprotokollen, z.B. Partikelbeschuss, Elektroporation und dergleichen, transferiert werden könnte. So stellt die Erfindung eine Transferkassette bereit, die eine Nucleotidsequenz umfasst, welche für ein rekombinantes Protein codiert, das eine erste ortsspezifische Rekombinase, fusioniert im Raster mit einer zweiten ortsspezifischen Rekombinase, umfasst, wobei die Nucleotidsequenz funktionell mit einem Promotor verknüpft ist, der eine Expression in einer eukaryotischen Zelle steuert.

[0037] In den Zusammensetzungen und Verfahren der Erfindung ist die DNA von Interesse von Targetstellen für zwei unterschiedliche ortsspezifische Rekombinasen flankiert. Mit "flankiert von bzw. durch" ist gemeint, dass die Rekombinations- oder Targetstellen direkt fortlaufend mit der DNA von Interesse sein können, oder es kann eine oder es können mehrere intervenierende Sequenzen zwischen einem oder beiden Enden der DNA von Interesse und den ortsspezifischen Rekombinationsstellen vorliegen. Intervenierende Sequenzen von besonderem Interesse würden Linker, Adapter, selektierbare Marker und/oder andere Stellen, die eine Vektorkonstruktion oder Analyse und Expressionskassette für ein Gen von Interesse unterstützen, umfassen. Targetstellen für ortsspezifische Rekombinasen sind dem Fachmann bekannt und werden in der gleichzeitig anhängigen vorläufigen Anmeldung 60/065 613 diskutiert. Beispiele für Targetstellen umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, FRT, FRT1, FRTS, FRT6, FRT7, andere FRT-Mutanten, loxP, loxP-Mutanten und dergleichen. Siehe z.B. Schlake und Bode (1994) *Biochemistry* 33:12746-12751; Huang et al. (1991) *Nucleic Acids Research* 19:443-448; Sadowski (1995) in *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Bd. 51, S. 53-91; Cox (1989) in *Mobile DNA*, Berg und Howe (Herausg.) American Society of Microbiology, Washington D.C., S. 116-670; Dixon et al. (1995) 18:449-458; Umlauf und Cox (1988) *The EMBO Journal* 7:1845-1852; Buchholz et al. (1996) *Nucleic Acids Research* 24:3118-3119; Kilby et al. (1993) *Trends Genet.* 9:413-421; Rossant und Geagy (1995) *Nat. Med.* 1: 592-594; Albert et al. (1995) *The Plant J.* 7:649-659; Bayley et al. (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:353-361; Odell et al. (1990) *Mol. Gen. Genet.* 223:369-378; Dale und Ow (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10558-105620; Qui et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1706-1710; Stuurman et al. (1996) *Plant Mol. Biol.* 32:901-913; und Dale et al. (1990) *Gene* 91:79-85.

[0038] Mit "Targetstelle für eine ortsspezifische Rekombinase" ist eine DNA-Sequenz gemeint, die durch eine bestimmte ortsspezifische Rekombinase erkannt wird. Dem Fachmann auf diesem Gebiet ist eine Vielzahl von Rekombinationsstellen bekannt, und diese können in Verfahren und Zusammensetzungen der Erfindung eingesetzt werden. Die Stelle kann die Sequenz der verwandten Stelle für eine gegebene Rekombinase haben oder kann modifiziert sein, solange sie fähig ist, als Rekombinationsstelle zu wirken. Die Stelle kann die Minimalsequenzen enthalten, die für eine Rekombination erforderlich sind, oder sie kann zusätzliche Sequenzen enthalten, die eine Rekombination verstärken. Beispiele für Rekombinationsstellen zur Verwendung in der Erfindung sind auf dem Fachgebiet bekannt und umfassen FRT- und loxP-Stellen. (Siehe zum Beispiel Schlake und Bode (1994) *Biochemistry* 33:12746-12751; Huang et al. (1991) *Nucleic Acids Research* 19:443-448; Paul D. Sadowski (1995) in *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* Bd. 51, S. 53-91; Michael M. Cox (1989) in *Mobile DNA*, Berg und Howe (Herausg.) American Society of Microbiology, Washington D.C., S. 116-670; Dixon et al. (1995) 18:449-458; Umlauf und Cox (1988) *The EMBO Journal* 7:1845-1852; Buchholz et al. (1996) *Nucleic Acids Research* 24:3118-3119; Kilby et al. (1993) *Trends Genet.* 9:413-421; Rossant und Geagy (1995) *Nat. Med.* 1: 592-594; Albert et al. (1995) *The Plant J.* 7:649-659; Bayley et al. (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:353-361; Odell et al. (1990) *Mol. Gen. Genet.* 223:369-378; Dale und Ow (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10558-105620; Qui et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1706-1710; Stuurman et al. (1996) *Plant Mol. Biol.* 32:901-913; Hartley et al. (1980) *Nature* 286:860-864; Sauer (1994) *Current Opinion in Biotechnology* 5:521-527; und Dale et al. (1990) *Gene* 91:79-85).

[0039] Jede loxP- und die FRT-Stelle enthält jeweils zwei invertierte Wiederholungen mit 13 Basenpaaren, die einen 8 Basenpaar-Spacer flankieren. Die FRT-Stelle enthält eine zusätzliche nicht-essentielle 13 Basenpaar-Wiederholung. Die Sequenzen der loxP- und FRT-Stellen sind in SEQ. ID NO: 1 und SEQ. ID NO: 2 gezeigt. Eine minimale FRT-Stelle (SEQ. ID NO: 10), die zwei 13 Basenpaar-Wiederholungen, getrennt durch einen 8 Basen-Spacer, umfasst, ist:

5'-GAAGTTCCTATTC[TCTAGAAA]GTATAGGAACTTC3'

worin die Nucleotide in den Klammern die Spacerregion anzeigen. Die Nucleotide in der Spacerregion können durch eine Kombination von Nucleotiden ersetzt werden, solange die zwei 13 Basen-Wiederholungen durch 8 Nucleotide getrennt werden. FLP ist eine konservative, ortsspezifische Rekombinase, die fähig ist, eine Inver-

sion einer Nucleinsäuresequenz, die zwischen zwei umgekehrt orientierten FRTs positioniert ist; eine Rekombination zwischen zwei Molekülen, die jeweils eine FRT-Stelle enthalten; und eine Exzision zwischen FRT-Stellen zu katalysieren. Die Kernregion ist nicht symmetrisch, und ihre Asymmetrie diktiert die Steuerbarkeit der Reaktion. Eine Rekombination zwischen umgekehrten FRT-Stellen verursacht eine Umkehr einer DNA-Sequenz zwischen diesen, wohingegen eine Rekombination zwischen direkt orientierten Stellen zu einer Exzision der DNA zwischen ihnen führt.

[0040] Nucleotidsequenzen, enthaltend eine DNA von Interesse, flankiert durch Targetstellen, Transferkassetten für zwei unterschiedliche ortsspezifische Rekombinasen und Vektoren, die diese Sequenzen tragen, können unter Verwendung von molekularbiologischen Standardtechniken konstruiert werden. Siehe z.B. Sambrook et al. (Herausg.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Ausgabe, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 1989).

[0041] Techniken zur Transformierung einer weiten Vielzahl von eukaryotischen Zellen, einschließlich höherer Pflanzenspezies, sind gut bekannt und in der technischen, wissenschaftlichen und Patentliteratur beschrieben. Siehe z.B. Weising et al., *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477 (1988). Diese Methoden sind zum Transformieren einer Pflanzelle mit den chimären Rekombinase-Expressionskassetten der Erfindung und mit DNAs von Interesse, flankiert durch Targetstellen für die chimäre Rekombinase, einsetzbar. Die Expressionskassette, die für die ortsspezifische Rekombinase codiert, kann im Pflanzengenom vor der Transformation der DNA von Interesse vorliegen oder kann um den Zeitpunkt der Transformation mit der T-DNA in die Pflanzelle transformiert werden, so dass sie transient exprimiert werden wird. Beispielsweise kann das DNA-Konstrukt direkt in die genomische DNA der Pflanzelle eingeführt werden, wobei Techniken, wie Elektroporation, PEG-Poration, Partikelbeschuss, Siliciumfaserabgabe oder Mikroinjektion von Pflanzenzellprotoplasten oder embryogem Callus, verwendet werden.

[0042] *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformationstechniken sind in der wissenschaftlichen Literatur gut beschrieben. Siehe z.B. Horsch et al., *Science* 233: 496-498 (1984), Fraley et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:4803 (1983), Kado (1991), *Crit. Rev. Plant Sci.* 10:1, und Moloney et al. (1989), *Plant Cell Reports* 8:238. Obgleich *Agrobacterium* in erster Linie in Dikotylen verwendbar ist, können durch *Agrobacterium* auch bestimmte Monokotylen transformiert werden. Beispielsweise wird die *Agrobacterium*-Transformation von Mais in US-Patent Nr. 5 550 318 beschrieben. Andere Verfahren der Agroinfektion umfassen *Agrobacterium* rhizogenes-vermittelte Transformation (siehe z.B. Lichtenstein und Fuller in: *Genetic Engineering*, Bd. 6, PWJ Rigby, Herausg., London, Academic Press, 1987; und Lichtenstein, C.P., und Draper, J., in: *DNA Cloning*, Bd. II, D.M. Glover, Herausg., Oxford, IRI Press, 1985), Anmeldung PCT/US87/02512 (WO 88/02405, veröffentlicht am 7. Apr. 1988) beschreibt die Verwendung von *A. rhizogenes*-Stamm A4 und seines Ri-Plasmids mit *A. tumefaciens*-Vektoren pARC8 oder pARC16.

[0043] Optimierte Verfahren und Vektoren zur *Agrobacterium*-vermittelten Transformation von Pflanzen in der Graminae-Familie, z.B. Reis und Mais, wurden von Heath et al. (1997) *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10:221-227; Hiei et al. (1994) *Plant J.* 6:271-282 und Ishida et al. (1996) *Nat. Biotech.* 14:745-750, beschrieben. Die Effizienz der Maistransformation wird durch eine Vielzahl von Faktoren, einschließlich der Typen und Stufen von Gewebe, das infiziert ist, der Konzentration von *Agrobacterium*, dem Gewebekulturmedium, den Ti-Vektoren und dem Mais-Genotyp beeinflusst. Superbinäre Vektoren, die die vir-Gene der *Agrobacterium*-Stämme A281 und A348 tragen, sind für eine hocheffiziente Transformation von Monokotylen einsetzbar.

[0044] Die Einführung von DNA-Konstrukten unter Verwendung der Polyethylenglykol-Präzipitation wird in Paszkowski et al., *Embo J.* 3:2717-2722 (1984), beschrieben. Elektroporationstechniken werden in Fromm et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:5824 (1985), beschrieben.

[0045] Ballistische Transformationstechniken werden in Klein et al., *Nature* 327:70-73 (1987), beschrieben.

[0046] Virale Mittel zur Einführung von DNA in Säugerzellen sind auf dem Fachgebiet bekannt. Insbesondere ist eine Reihe von Vektorsystemen zur Einführung von fremden oder nativen Genen in Säugerzellen bekannt. Diese umfassen SV40-Virus (siehe z.B. Okayama et al. (1985) *Molec. Cell Biol.* 5:1136-1142); Rinder-Papillom-Virus (siehe z.B. DiMaio et al. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:4030-4034); Adenovirus (siehe z.B. Morin et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4626; Yifan et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1401-1405; Yang et al. (1996) *Gene Ther.* 3:137-144; Tripathy et al. (1996) *Nat. Med.* 2:545-550; Quantin et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2581-2584; Rosenfeld et al. (1991) *Science* 252:431-434; Wagner (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6099-6103; Curiel et al. (1992) *Human Gene Therapy* 3:147-154; Curiel (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8850-8854; LeGal LaSalle et al. (1993) *Science* 259:590-599; Kass-Eis-

ler et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11498-11502); Adeno-assoziiertes Virus (siehe z.B. Muzyczka et al. (1994) J. Clin. Invest. 94:1351; Xiao et al. (1996) J. Virol. 70:8098-8108); Herpes simplex-Virus (siehe z.B. Geller et al. (1988) Science 241:1667; Huard et al. (1995) Gene Therapy 2:385-392; US-Patent Nr. 5 501 979); Vektoren auf Retrovirus-Basis (siehe z.B. Curran et al. (1982) J. Virol. 44: 674-682; Gazit et al. (1986) J. Virol. 60: 19-28; Miller, A. D. (1992) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 158:1-24; Cavanaugh et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:7071-7075; Smith et al. (1990) Molecular and Cellular Biology 10:3268-3271). Siehe auch Wu et al. (1991) J. Biol. Chem. 266:14338-14342; Wu und Wu, J. Biol Chem. (1988) 263:14621-14624; Wu et al. (1989) J. Biol. Chem. 264:16985-16987; Zenke et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3655-3659; Wagner et al. (1990) 87:3410-3414.

[0047] DNA kann auch durch direkten DNA-Transfer in Pollen in Pflanzen eingeführt werden, wie es von Zhou et al., Methods in Enzymology, 101:433 (1983); D. Hess, Intern Rev. Cytol., 107:367 (1987); Luo et al., Plant Mol. Biol. Reporter, 6:165 (1988), beschrieben ist. Eine Expression von Polypeptid-codierenden Genen kann durch Injektion der DNA in reproduktive Organe einer Pflanze erreicht werden, wie es von Pena et al., Nature, 325:274 (1987), beschrieben wird. DNA kann auch direkt in die Zellen unreifer Embryos injiziert werden und die Rehydratation von getrockneten Embryos durchgeführt werden, wie bei Neuhaus et al., Theor. Appl. Genet., 75:30 (1987); und Benbrook et al., in Proceedings Bio Expo 1986, Butterworth, Stoneham, Mass., S. 27-54 (1986) beschrieben. Auf dem Fachgebiet ist eine Vielzahl von Pflanzenviren bekannt, die als Vektoren verwendet werden können; diese umfassen Blumenkohl-Mosaikvirus (CaMV), Geminivirus, Trespenmosaikvirus und Tabak-Mosaikvirus.

[0048] Pflanzenzellen, die mit einer chimären Rekombinase-Expressions-kassette stabil transformiert sind, können z.B. aus einzelnen Zellen, Callusgewebe oder Blattscheiben nach Standard-Pflanzengewebe-Kultur-techniken regeneriert werden. Auf dem Fachgebiet ist gut bekannt, dass verschiedene Zellen, Gewebe und Organe aus fast jeder Pflanze erfolgreich kultiviert werden können, um eine ganze Pflanze zu regenerieren. Pflanzenregeneration aus kultivierten Protoplasten ist bei Evans et al., Protoplasts Isolation and Culture, Handbook of Plant Cell Culture, Macmillan Publishing Company, New York, S. 124-176 (1983); und Binding, Regeneration of Plants, Plant Protoplasts, CRC Press, Boca Raton, S. 21-73 (1985), beschrieben.

[0049] Die Regeneration von Pflanzen, die die rekombinanten Gene enthalten, kann erreicht werden, wie es von Horsch et al., Science, 227:1229-1231 (1985), beschrieben wurde. Bei diesem Verfahren werden Transformanten in Gegenwart eines Selektionsmittels und in einem Medium, das die Regeneration von Schösslingen in der Pflanzenspezies, die transformiert wird, induziert, wachsen gelassen, wie es von Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80:4803 (1983), beschrieben wird. Dieses Verfahren produziert typischerweise Schösslinge innerhalb von zwei bis vier Wochen, und diese Transformantenschösslinge werden dann auf ein geeignetes Wurzel-induzierendes Medium, das das selektive Mittel und ein Antibiotikum, um bakterielles Wachstum zu verhindern, enthält, transferiert. Transgene Pflanzen der vorliegenden Erfindung können fertil oder steril sein.

[0050] Eine Regeneration kann auch aus Pflanzencallus, -explantaten, -Organen oder Teilen davon erhalten werden. Solche Regenerationstechniken sind allgemein bei Klee et al., Ann. Rev. of Plant Phys. 38:467-486 (1987), beschrieben. Die Regeneration von Pflanzen entweder aus Einzelpflanzenprotoplasten oder verschiedenen Explantaten ist auf dem Fachgebiet gut bekannt. Siehe z.B. Methods for Plant Molecular Biology, A. Weissbach und H. Weissbach, Herausg., Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (1988). Dieser Regenerations- und Wachstumsprozess beinhaltet die Schritte der Selektion von Transformantenzellen und -Schösslingen, Bewurzeln der Transformantenschösslinge und Wachsenlassen der Pflänzchen in Erde. Für eine Maiszellkultur und eine Regeneration siehe allgemein The Maize Handbook Freeling und Walbot, Herausg., Springer, New York (1994); Corn and Corn Improvement, 3. Ausgabe, Sprague und Dudley, Herausg., American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin (1988).

[0051] Ein Fachmann wird erkennen, dass, nachdem eine DNA, z.B. eine chimäre Rekombinase-Expressions-kassette oder eine Targetstelle für eine chimäre Rekombinase, stabil in transgene Pflanzen eingebaut wurde und als funktionsfähig bestätigt wurde, sie durch sexuelle Kreuzung in andere Pflanzen eingeführt werden kann. Es kann eine beliebige einer Reihe von Standardzüchtungstechniken verwendet werden, die von der zu kreuzenden Spezies abhängen.

[0052] Die Verfahren und Zusammensetzungen der Erfindung sind einsetzbar, um eine DNA von Interesse in das Genom einer beliebigen Wirtszelle, einschließlich eines Pflanzenwirts, zu integrieren. Der Ausdruck "Pflanze", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf ganze Pflanzen, Pflanzenorgane (z.B. Blätter, Stängel, Wurzeln, usw.), Samen und Pflanzenzellen und die Nachkommenschaft derselben. Der Ausdruck Pflanzenzelle,

wie er hierin verwendet wird, umfasst, ohne Beschränkung, Samen, Suspensionskulturen, Embryos, Meristemregionen, Callusgewebe, Blätter, Wurzeln, Schösslinge, Gametophyten, Sporophyten, Pollen und Mikrosporen. Die Pflanzenklasse, die in den Verfahren der Erfindung eingesetzt werden kann, ist im Allgemeinen so breit wie die Klasse höherer Pflanzen, die Transformationstechniken zugänglich ist, einschließlich monokotylen und dikotylen Pflanzen. Eine besonders bevorzugte Monokotyle ist Mais. Andere Monokotyle von besonderem Interesse umfassen Weizen, Reis, Gerste, Sorghum und Roggen. Dikotyle von besonderem Interesse umfassen Sojabohne, Brassica, Sonnenblume, Alfalfa und Saflor.

[0053] Aufgrund der Verwendung der chimären ortsspezifischen Rekombinasen und Targetstellen, die hier bereitgestellt werden, können die Zellen, die durch die erfindungsgemäßen Verfahren transformiert wurden, von anderen Transformationsverfahren unterscheidbar sein, da die modifizierten Zellen der Erfindung Nucleotidsequenzen von Interesse inseriert in das Genom, flankiert durch Targetstellen für verschiedene Rekombinasen, enthalten werden.

[0054] Die folgenden Beispiele werden zur Erläuterung, nicht zur Beschränkung angeführt.

EXPERIMENTELLER TEIL

Beispiel 1

Konstruktion von Vektoren, die eine DNA von Interesse, flankiert durch Targetstellen für eine chimäre ortsspezifische Rekombinase, enthalten

[0055] DNA-Fragmente, die eine DNA von Interesse flankiert durch loxP- und FRT-Targetstellen enthalten, werden entweder durch Synthetisieren, Anlagern und Ligieren komplementärer Oligonucleotide oder durch Erzeugung von Primern zur PCR-Amplifikation einer DNA von Interesse, die loxP- und FRT-Stellen zusätzlich zu Restriktionsstellen, die zur Klonierung in einen Vektor der Wahl einsetzbar sind, enthält, konstruiert.

[0056] Beispielsweise können lange PCR-Primer entwickelt werden, in denen das 3'-Ende des Primers an das 5'-Ende der DNA von Interesse hybridisiert und das 5'-Ende des Primers außerdem loxP- oder FRT-Stellen und nützliche Klonierungsstellen enthält. Das resultierende PCR-Produkt wird mit dem geeigneten Restriktionsenzym verdaut und in einen geeigneten Vektor inseriert.

Beispiel 2

[0057] Exzision einer FRT-Stelle durch FLPm und die Cre:FLPm-chimäre Rekombinase Eine Transferkassette, die für eine Cre-FLPm-chimäre Rekombinase codiert, wurde in Pflanzenzellen transformiert, die eine Expressionskassette haben, welche für GUS, angetrieben durch den Ubiquitin-Promotor, codiert, wobei eine Sequenz durch identische FRT- oder loxP-Stellen flankiert wird, die das offene GUS-Leseraster unterbrechen. [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#) zeigen, dass die Cre-FLPm-chimäre Rekombinase entweder an der FRT-Stelle oder der loxP-Stelle unabhängig funktionell ist, was durch die Fähigkeit, GUS-Aktivität nach Exzision von Sequenzen zwischen zwei identischen Targetstellen zu aktivieren, wodurch die GUS-Aktivität unter die Kontrolle des Ubiquitin-Promotors gestellt wird, gemessen wird.

[0058] Alle Veröffentlichungen und Patentanmeldungen, die in der Beschreibung genannt werden, sind ein Hinweis für den Level des Fachmanns auf dem Gebiet, zu dem die Erfindung gehört.

[0059] Obgleich die vorstehend beschriebene Erfindung durch Erläuterung und Beispiel zu Zwecken eines klaren Verständnisses detailliert beschrieben wurde, wird es klar sein, dass bestimmte Änderungen und Modifikationen innerhalb des Rahmens der beigefügten Ansprüche durchgeführt werden können.

<110> Pioneer Hi-Bred International, Inc.

<120> Ein neues Verfahren zur Integration von
Fremd-DNA in eukaryotische Genome

<130> N.79644

<140> EP 98960261.0

<141> 1998-11-17

<150> 60/099,435

<151> 1998-09-08

<150> 60/056,627

<151> 1997-11-18

<150> 60/065,613

<151> 1997-11-18

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 343

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Cre-Protein
aus Bakteriophage P1 mit Mais-bevorzugten Codons
(moCRE)

<400> 1

Met Ser Asn Leu Leu Thr Val His Gln Asn Leu Pro Ala Leu Pro Val
1 5 10 15

Asp Ala Thr Ser Asp Glu Val Arg Lys Asn Leu Met Asp Met Phe Arg
20 25 30

Asp Arg Gln Ala Phe Ser Glu His Thr Trp Lys Met Leu Leu Ser Val
35 40 45

Cys Arg Ser Trp Ala Ala Trp Cys Lys Leu Asn Asn Arg Lys Trp Phe
50 55 60

Pro Ala Glu Pro Glu Asp Val Arg Asp Tyr Leu Leu Tyr Leu Gln Ala
65 70 75 80

Arg Gly Leu Ala Val Lys Thr Ile Gln Gln His Leu Gly Gln Leu Asn
85 90 95

Met Leu His Arg Arg Ser Gly Leu Pro Arg Pro Ser Asp Ser Asn Ala
100 105 110

Val Ser Leu Val Met Arg Arg Ile Arg Lys Glu Asn Val Asp Ala Gly
 115 120 125
 Glu Arg Ala Lys Gln Ala Leu Ala Phe Glu Arg Thr Asp Phe Asp Gln
 130 135 140
 Val Arg Ser Leu Met Glu Asn Ser Asp Arg Cys Gln Asp Ile Arg Asn
 145 150 155 160
 Leu Ala Phe Leu Gly Ile Ala Tyr Asn Thr Leu Leu Arg Ile Ala Glu
 165 170 175
 Ile Ala Arg Ile Arg Val Lys Asp Ile Ser Arg Thr Asp Gly Gly Arg
 180 185 190
 Met Leu Ile His Ile Gly Arg Thr Lys Thr Leu Val Ser Thr Ala Gly
 195 200 205
 Val Glu Lys Ala Leu Ser Leu Gly Val Thr Lys Leu Val Glu Arg Trp
 210 215 220
 Ile Ser Val Ser Gly Val Ala Asp Asp Pro Asn Asn Tyr Leu Phe Cys
 225 230 235 240
 Arg Val Arg Lys Asn Gly Val Ala Ala Pro Ser Ala Thr Ser Gln Leu
 245 250 255
 Ser Thr Arg Ala Leu Glu Gly Ile Phe Glu Ala Thr His Arg Leu Ile
 260 265 270
 Tyr Gly Ala Lys Asp Asp Ser Gly Gln Arg Tyr Leu Ala Trp Ser Gly
 275 280 285
 His Ser Ala Arg Val Gly Ala Ala Arg Asp Met Ala Arg Ala Gly Val
 290 295 300
 Ser Ile Pro Glu Ile Met Gln Ala Gly Gly Trp Thr Asn Val Asn Ile
 305 310 315 320
 Val Met Asn Tyr Ile Arg Asn Leu Asp Ser Glu Thr Gly Ala Met Val
 325 330 335
 Arg Leu Leu Glu Asp Gly Asp
 340

<210> 2

<211> 1032

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Nucleotidsequenz, die für Cre-Protein aus Bakteriophage P1 codiert. Mais-bevorzugte Codons (mcCRE)

<400> 2

```

atgtccaacc tgctcacggt tcaccagaac ctcccggtc ttccagtggg cgcgacgtcc 60
gatgaagtca ggaagaacct catggacatg ttccgcgaca ggcaagcgtt cagcgagcac 120
acctggaaga tgctgctctc cgtctgccgc tcctgggctg catggtgcaa gctgaacaac 180
aggaagtggg tccccgctga gcccgaggac gtgagggatt accttctgta cctgcaagct 240
cgcgggctgg cagtgaagac catccagcaa caccttggac aactgaacat gcttcacagg 300
cgetccggcc tccccgcccc cagcgactcg aacgccgtga gcctcgtcat gcgccgcatc 360
aggaaggaaa acgtcgatgc cggcgaaagg gcaaagcagg ccctcgcgtt cgagaggacc 420
gatttcgacc aggtccgcag cctgatggag aacagcgaca ggtgccagga cattaggaac 480
ctggcgttcc tcggaattgc atacaacacg ctctcagga tcgcggaaat tgccccgatt 540
cgcgtgaagg acattagccg caccgacggc ggcaggatgc ttatccacat tggcaggacc 600
aagacgctcg tttccaccgc aggcgtcgaa aaggccctca gcctcggagt gaccaagctc 660
gtcgaacgct ggatctccgt gtccggcgtc gcggacgacc caaacaacta cctcttctgc 720
cgcgtccgca agaacggggg ggctgcccct agcgcacca gccaaactcag cacgagggcc 780
ttggaaggta ttttcgaggc caccaccgc ctgatctacg gcgcgaagga tgacagcggg 840
caacgctacc tcgcatggtc cgggcaactc gcccgcggtg gagctgctag ggacatggcc 900
cgcgccggtg tttccatccc cgaaatcatg caggcgggtg gatggacgaa cgtgaacatt 960
gtcatgaact acattcgcaa ccttgacagc gagacgggcg caatgggtcg cctcctggaa 1020
gatggtgact ga 1032

```

<210> 3

<211> 781

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Cre:FLP_m-
Polypeptid, Cre aus Bakteriophage P1 und FLP aus
Saccharomyces mit Mais-bevorzugten Codons

<400>

```

Met Ala Asn Leu Leu Thr Val His Gln Asn Leu Pro Ala Leu Pro Val
  1           5           10          15
Asp Ala Thr Ser Asp Glu Val Arg Lys Asn Leu Met Asp Met Phe Arg
          20           25           30
Asp Arg Gln Ala Phe Ser Glu His Thr Trp Lys Met Leu Leu Ser Val
          35           40           45
Cys Arg Ser Trp Ala Ala Trp Cys Lys Leu Asn Asn Arg Lys Trp Phe
          50           55           60
Pro Ala Glu Pro Glu Asp Val Arg Asp Tyr Leu Leu Tyr Leu Gln Ala
          65           70           75           80
Arg Gly Leu Ala Val Lys Thr Ile Gln Gln His Leu Gly Gln Leu Asn
          85           90           95
Met Leu His Arg Arg Ser Gly Leu Pro Arg Pro Ser Asp Ser Asn Ala
          100          105          110
Val Ser Leu Val Met Arg Arg Ile Arg Lys Glu Asn Val Asp Ala Gly
          115          120          125

```

Glu Arg Ala Lys Gln Ala Leu Ala Phe Glu Arg Thr Asp Phe Asp Gln
 130 135 140
 Val Arg Ser Leu Met Glu Asn Ser Asp Arg Cys Gln Asp Ile Arg Asn
 145 150 155 160
 Leu Ala Phe Leu Gly Ile Ala Tyr Asn Thr Leu Leu Arg Ile Ala Glu
 165 170 175
 Ile Ala Arg Ile Arg Val Lys Asp Ile Ser Arg Thr Asp Gly Gly Arg
 180 185 190
 Met Leu Ile His Ile Gly Arg Thr Lys Thr Leu Val Ser Thr Ala Gly
 195 200 205
 Val Glu Lys Ala Leu Ser Leu Gly Val Thr Lys Leu Val Glu Arg Trp
 210 215 220
 Ile Ser Val Ser Gly Val Ala Asp Asp Pro Asn Asn Tyr Leu Phe Cys
 225 230 235 240
 Arg Val Arg Lys Asn Gly Val Ala Ala Pro Ser Ala Thr Ser Gln Leu
 245 250 255
 Ser Thr Arg Ala Leu Glu Gly Ile Phe Glu Ala Thr His Arg Leu Ile
 260 265 270
 Tyr Gly Ala Lys Asp Asp Ser Gly Gln Arg Tyr Leu Ala Trp Ser Gly
 275 280 285
 His Ser Ala Arg Val Gly Ala Ala Arg Asp Met Ala Arg Ala Gly Val
 290 295 300
 Ser Ile Pro Glu Ile Met Gln Ala Gly Gly Trp Thr Asn Val Asn Ile
 305 310 315 320
 Val Met Asn Tyr Ile Arg Asn Leu Asp Ser Glu Thr Gly Ala Met Val
 325 330 335
 Arg Leu Leu Glu Asp Gly Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 340 345 350
 Gly Gly Ser Asp Pro Thr Met Pro Gln Phe Asp Ile Leu Cys Lys Thr
 355 360 365
 Pro Pro Lys Val Leu Val Arg Gln Phe Val Glu Arg Phe Glu Arg Pro
 370 375 380
 Ser Gly Glu Lys Ile Ala Leu Cys Ala Ala Glu Leu Thr Tyr Leu Cys
 385 390 395 400
 Trp Met Ile Thr His Asn Gly Thr Ala Ile Lys Arg Ala Thr Phe Met
 405 410 415
 Ser Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Asn Ser Leu Ser Phe Asp Ile Val Asn
 420 425 430

Lys Ser Leu Gln Phe Lys Tyr Lys Thr Gln Lys Ala Thr Ile Leu Glu
 435 440 445

Ala Ser Leu Lys Lys Leu Ile Pro Ala Trp Glu Phe Thr Ile Ile Pro
 450 455 460

Tyr Tyr Gly Gln Lys His Gln Ser Asp Ile Thr Asp Ile Val Ser Ser
 465 470 475 480

Leu Gln Leu Gln Phe Glu Ser Ser Glu Glu Ala Asp Lys Gly Asn Ser
 485 490 495

His Ser Lys Lys Met Leu Lys Ala Leu Leu Ser Glu Gly Glu Ser Ile
 500 505 510

Trp Glu Ile Thr Glu Lys Ile Leu Asn Ser Phe Glu Tyr Thr Ser Arg
 515 520 525

Phe Thr Lys Thr Lys Thr Leu Tyr Gln Phe Leu Phe Leu Ala Thr Phe
 530 535 540

Ile Asn Cys Gly Arg Phe Ser Asp Ile Lys Asn Val Asp Pro Lys Ser
 545 550 555 560

Phe Lys Leu Val Gln Asn Lys Tyr Leu Gly Val Ile Ile Gln Cys Leu
 565 570 575

Val Thr Glu Thr Lys Thr Ser Val Ser Arg His Ile Tyr Phe Phe Ser
 580 585 590

Ala Arg Gly Arg Ile Asp Pro Leu Val Tyr Leu Asp Glu Phe Leu Arg
 595 600 605

Asn Ser Glu Pro Val Leu Lys Arg Val Asn Arg Thr Gly Asn Ser Ser
 610 615 620

Ser Asn Lys Gln Glu Tyr Gln Leu Leu Lys Asp Asn Leu Val Arg Ser
 625 630 635 640

Tyr Asn Lys Ala Leu Lys Lys Asn Ala Pro Tyr Ser Ile Phe Ala Ile
 645 650 655

Lys Asn Gly Pro Lys Ser His Ile Gly Arg His Leu Met Thr Ser Phe
 660 665 670

Leu Ser Met Lys Gly Leu Thr Glu Leu Thr Asn Val Val Gly Asn Trp
 675 680 685

Ser Asp Lys Arg Ala Ser Ala Val Ala Arg Thr Thr Tyr Thr His Gln
 690 695 700

Ile Thr Ala Ile Pro Asp His Tyr Phe Ala Leu Val Ser Arg Tyr Tyr
 705 710 715 720

Ala Tyr Asp Pro Ile Ser Lys Glu Met Ile Ala Leu Lys Asp Glu Thr
 725 730 735

Asn Pro Ile Glu Glu Trp Gln His Ile Glu Gln Leu Lys Gly Ser Ala
 740 745 750

Glu Gly Ser Ile Arg Tyr Pro Ala Trp Asn Gly Ile Ile Ser Gln Glu
 755 760 765

Val Leu Asp Tyr Leu Ser Ser Tyr Ile Asn Arg Arg Ile
 770 775 780

<210> 4

<211> 2346

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Nucleotid-
 sequenz, die für ein Cre:FLPm-Polypeptid codiert,
 Cre aus Bakteriophage P1 und FLP (Mais-
 bevorzugte Codons) aus Saccharomyces

<400> 4

```

atggccaatt tactgaccgt acacccaaaat ttgcctgcat taccgggtcga tgcaacgagt 60
gatgaggttc gcaagaacct gatggacatg ttcagggatc gccaggcggt ttctgagcat 120
acctggaaaa tgcttctgtc cgtttgccgg tcgtggggcgg catgggtgcaa gttgaataac 180
cggaaatggg ttcccgcaga acctgaagat gttcgcgatt atcttctata tcttcaggcg 240
cgcggtctgg cagtaaaaaac tatccagcaa catttgggccc agctaaacat gcttcatcgt 300
cggtcggggc tgccacgacc aagtgcacgc aatgctgttt cactggttat gcggcggatc 360
cgaaaaaata acgttgatgc cgggtgaacgt gcaaaaCagg ctctagcgtt cgaacgcact 420
gatttcgacc aggttcgttc actcatggaa aatagcgcgc gctgccagga tatacgtaat 480
ctggcatttc tggggattgc ttataacacc ctggtacgta tagccgaaat tgccaggatc 540
agggttaaag atatctcacg tactgacggt gggagaatgt taatccatat tggcagaacg 600
aaaacgctgg ttagcaccgc aggtgtagag aaggcactta gcctgggggt aactaaactg 660
gtcagagcat ggatttccgt ctctgggtgta gctgatgatc cgaataacta cctgttttgc 720
cgggtcagaa aaaatgggtg tgccgcgcca tctgccacca gccagctate aactcgcgcc 780
ctggaaggga tttttgaagc aactcatcga ttgatttacg gcgctaagga tgactctggg 840
cagagatacc tggcctggtc tggacacagt gccctgtcgc gagccgcgcg agatatggcc 900
cgcgctggag tttcaatacc ggagatcatg caagctgggtg gctggaccaaa tgtaaatatt 960
gtcatgaact atatccgtaa cctgggatagt gaaacagggg caatgggtgcg cctgctggaa 1020
gatggcgatg gtggcggcag cgggtggcggc tccggcgggtg gctcggatcc aacaatgcc 1080
cagttcgaca tccctctgcaa gacccccccc aaggtgctcg tgaggcagtt cgtggagagg 1140
ttcgagagge cctccggcga gaagatcgcc ctctgcgccg ccgagctcac ctacctctgc 1200
tggatgatca cccacaacgg caccgccatt aagagggcca ccttcatgtc atacaacacc 1260
atcatctcca actcctctc ctctgcacac gtgaacaagt cctccagtt caaatacaag 1320
accagaagg ccaccatcct cgaggcctcc ctcaagaagc tcatccccgc ctgggagttc 1380
accatcatcc cctactacgy ccagaagcac cagtccgaca tcaccgacat cgtgtcatcc 1440
ctccagcttc agttcgagtc ctccgaggag gctgacaagg gcaactccca ctccaagaag 1500
atgctgaagg cctcctctc cgagggcgag tccatctggg agatcaccga gaagatcctc 1560
aactccttgc agtacacctc caggttcact aagaccaaga ccctctacca gttcctcttc 1620
ctcgccacct tcatcaactg cggcaggttc tcagacatca agaacgtgga ccccaagtcc 1680
ttcaagctcg tgcagaacaa gtacctcggc gtgatcatcc agtgectcgt gaccgagacc 1740
aagacctccg tgtccaggca catctacttc ttctccgctc gcggcaggat cgacccccctc 1800
gtgtacctcg acgagttcct caggaactca gagcccgtgc tcaagagggg gaacaggacc 1860
ggcaactcct cctccaacaa gcaggagtac cagctcctca aggacaacct cgtgaggtcc 1920
tacaacaagg cctcaagaa gaacgcccc tactccatct tcgccatcaa gaacggcccc 1980
aagtcccaca tcggtaggca cctcatgacc tccttctctc caatgaaggg cctcaccgag 2040
    
```

```

ctcaccaacg tgggtgggcaa ctgggtccgac aagagggcct ccgcccgtggc caggaccacc 2100
tacaccacc agatcaccgc catccccgac cactacttcg ccctcgtgtc aaggtactac 2160
gcctacgacc ccatactccaa ggagatgatc gccctcaagg acgagactaa ccccatcgag 2220
gagtggcagc acatcgagca gctcaagggc tccgccgagg gctccatcag gtaccccgcc 2280
tggaacggca tcatactccca ggaggtgctc gactacctct cctcctacat caacaggagg 2340
atctga
2346

```

```

<210> 5
<211> 2346
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

```

```

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz,
die für moCre:FLPm codiert, Cre aus Bakteriophage
P1 und FLP aus Saccharomyces, beide Mais-
bevorzugte Codons

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2346)

```

```

<400> 5
atg tcc aac ctg ctc acg gtt cac cag aac ctt ccg gct ctt cca gtg 48
Met Ser Asn Leu Leu Thr Val His Gln Asn Leu Pro Ala Leu Pro Val
1 5 10 15
gac gcg acg tcc gat gaa gtc agg aag aac ctc atg gac atg ttc cgc 96
Asp Ala Thr Ser Asp Glu Val Arg Lys Asn Leu Met Asp Met Phe Arg
20 25 30
gac agg caa gcg ttc agc gag cac acc tgg aag atg ctg ctc tcc gtc 144
Asp Arg Gln Ala Phe Ser Glu His Thr Trp Lys Met Leu Leu Ser Val
35 40 45
tgc cgc tcc tgg gct gca tgg tgc aag ctg aac aac agg aag tgg ttc 192
Cys Arg Ser Trp Ala Ala Trp Cys Lys Leu Asn Asn Arg Lys Trp Phe
50 55 60
ccc gct gag ccc gag gac gtg agg gat tac ctt ctg tac ctg caa gct 240
Pro Ala Glu Pro Glu Asp Val Arg Asp Tyr Leu Leu Tyr Leu Gln Ala
65 70 75 80
cgc ggg ctg gca gtg aag acc atc cag caa cac ctt gga caa ctg aac 288
Arg Gly Leu Ala Val Lys Thr Ile Gln Gln His Leu Gly Gln Leu Asn
85 90 95
atg ctt cac agg cgc tcc ggc ctc ccg cgc ccc agc gac tcc aac gcc 336
Met Leu His Arg Arg Ser Gly Leu Pro Arg Pro Ser Asp Ser Asn Ala
100 105 110
gtg agc ctc gtc atg cgc cgc atc agg aag gaa aac gtc gat gcc gcc 384
Val Ser Leu Val Met Arg Arg Ile Arg Lys Glu Asn Val Asp Ala Gly
115 120 125

```

gaa agg gca aag cag gcc ctc gcg ttc gag agg acc gat ttc gac cag	432
Glu Arg Ala Lys Gln Ala Leu Ala Phe Glu Arg Thr Asp Phe Asp Gln	
130 135 140	
gtc cgc agc ctg atg gag aac agc gac agg tgc cag gac att agg aac	480
Val Arg Ser Leu Met Glu Asn Ser Asp Arg Cys Gln Asp Ile Arg Asn	
145 150 155 160	
ctg gcg ttc ctc gga att gca tac aac acg ctc ctc agg atc gcg gaa	528
Leu Ala Phe Leu Gly Ile Ala Tyr Asn Thr Leu Leu Arg Ile Ala Glu	
165 170 175	
att gcc cgc att cgc gtg aag gac att agc cgc acc gac ggc ggc agg	576
Ile Ala Arg Ile Arg Val Lys Asp Ile Ser Arg Thr Asp Gly Gly Arg	
180 185 190	
atg ctt atc cac att ggc agg acc aag acg ctc gtt tcc acc gca ggc	624
Met Leu Ile His Ile Gly Arg Thr Lys Thr Leu Val Ser Thr Ala Gly	
195 200 205	
gtc gaa aag gcc ctc agc ctc gga gtg acc aag ctc gtc gaa cgc tgg	672
Val Glu Lys Ala Leu Ser Leu Gly Val Thr Lys Leu Val Glu Arg Trp	
210 215 220	
atc tcc gtg tcc ggc gtc gcg gac gac cca aac aac tac ctc ttc tgc	720
Ile Ser Val Ser Gly Val Ala Asp Asp Pro Asn Asn Tyr Leu Phe Cys	
225 230 235 240	
cgc gtc cgc aag aac ggg gtg gct gcc cct agc gcc acc agc caa ctc	768
Arg Val Arg Lys Asn Gly Val Ala Ala Pro Ser Ala Thr Ser Gln Leu	
245 250 255	
agc acg agg gcc ttg gaa ggt att ttc gag gcc acc cac cgc ctg atc	816
Ser Thr Arg Ala Leu Glu Gly Ile Phe Glu Ala Thr His Arg Leu Ile	
260 265 270	
tac ggc gcg aag gat gac agc ggt caa cgc tac ctc gca tgg tcc ggg	864
Tyr Gly Ala Lys Asp Asp Ser Gly Gln Arg Tyr Leu Ala Trp Ser Gly	
275 280 285	
cac tcc gcc cgc gtt gga gct gct agg gac atg gcc cgc gcc ggt gtt	912
His Ser Ala Arg Val Gly Ala Ala Arg Asp Met Ala Arg Ala Gly Val	
290 295 300	
tcc atc ccc gaa atc atg cag gcg ggt gga tgg acg aac gtg aac att	960
Ser Ile Pro Glu Ile Met Gln Ala Gly Gly Trp Thr Asn Val Asn Ile	
305 310 315 320	
gtc atg aac tac att cgc aac ctt gac agc gag acg ggc gca atg gtt	1008
Val Met Asn Tyr Ile Arg Asn Leu Asp Ser Glu Thr Gly Ala Met Val	
325 330 335	
cgc ctc ctg gaa gat ggc gat ggt ggc ggc agc ggt ggc ggc tcc ggc	1056
Arg Leu Leu Glu Asp Gly Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly	
340 345 350	

ggc ggc tgc gat cca aca atg ccc cag ttc gac atc ctc tgc aag acc	1104
Gly Gly Ser Asp Pro Thr Met Pro Gln Phe Asp Ile Leu Cys Lys Thr	
355 360 365	
ccc ccc aag gtg ctc gtg agg cag ttc gtg gag agg ttc gag agg ccc	1152
Pro Pro Lys Val Leu Val Arg Gln Phe Val Glu Arg Phe Glu Arg Pro	
370 375 380	
tcc ggc gag aag atc gcc ctc tgc gcc gcc gag ctc acc tac ctc tgc	1200
Ser Gly Glu Lys Ile Ala Leu Cys Ala Ala Glu Leu Thr Tyr Leu Cys	
385 390 395 400	
tgg atg atc acc cac aac ggc acc gcc att aag agg gcc acc ttc atg	1248
Trp Met Ile Thr His Asn Gly Thr Ala Ile Lys Arg Ala Thr Phe Met	
405 410 415	
tca tac aac acc atc atc tcc aac tcc ctc tcc ttc gac atc gtg aac	1296
Ser Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Asn Ser Leu Ser Phe Asp Ile Val Asn	
420 425 430	
aag tcc ctc cag ttc aaa tac aag acc cag aag gcc acc atc ctc gag	1344
Lys Ser Leu Gln Phe Lys Tyr Lys Thr Gln Lys Ala Thr Ile Leu Glu	
435 440 445	
gcc tcc ctc aag aag ctc atc ccc gcc tgg gag ttc acc atc atc ccc	1392
Ala Ser Leu Lys Lys Leu Ile Pro Ala Trp Glu Phe Thr Ile Ile Pro	
450 455 460	
tac tac ggc cag aag cac cag tcc gac atc acc gac atc gtg tca tcc	1440
Tyr Tyr Gly Gln Lys His Gln Ser Asp Ile Thr Asp Ile Val Ser Ser	
465 470 475 480	
ctc cag ctt cag ttc gag tcc tcc gag gag gct gac aag ggc aac tcc	1488
Leu Gln Leu Gln Phe Glu Ser Ser Glu Glu Ala Asp Lys Gly Asn Ser	
485 490 495	
cac tcc aag aag atg ctg aag gcc ctc ctc tcc gag ggc gag tcc atc	1536
His Ser Lys Lys Met Leu Lys Ala Leu Leu Ser Glu Gly Glu Ser Ile	
500 505 510	
tgg gag atc acc gag aag atc ctc aac tcc ttc gag tac acc tcc agg	1584
Trp Glu Ile Thr Glu Lys Ile Leu Asn Ser Phe Glu Tyr Thr Ser Arg	
515 520 525	
ttc act aag acc aag acc ctc tac cag ttc ctc ttc ctc gcc acc ttc	1632
Phe Thr Lys Thr Lys Thr Leu Tyr Gln Phe Leu Phe Leu Ala Thr Phe	
530 535 540	
atc aac tgc ggc agg ttc tca gac atc aag aac gtg gac ccc aag tcc	1680
Ile Asn Cys Gly Arg Phe Ser Asp Ile Lys Asn Val Asp Pro Lys Ser	
545 550 555 560	
ttc aag ctc gtg cag aac aag tac ctc ggc gtg atc atc cag tgc ctc	1728
Phe Lys Leu Val Gln Asn Lys Tyr Leu Gly Val Ile Ile Gln Cys Leu	
565 570 575	

gtg acc gag acc aag acc tcc gtg tcc agg cac atc tac ttc ttc tcc 1776
Val Thr Glu Thr Lys Thr Ser Val Ser Arg His Ile Tyr Phe Phe Ser
580 585 590

gct cgc ggc agg atc gac ccc ctc gtg tac ctc gac gag ttc ctc agg 1824
Ala Arg Gly Arg Ile Asp Pro Leu Val Tyr Leu Asp Glu Phe Leu Arg
595 600 605

.aac tca gag ccc gtg ctc aag agg gtg aac agg acc ggc aac tcc tcc 1872
Asn Ser Glu Pro Val Leu Lys Arg Val Asn Arg Thr Gly Asn Ser Ser
610 615 620

tcc aac aag cag gag tac cag ctc ctc aag gac aac ctc gtg agg tcc 1920
Ser Asn Lys Gln Glu Tyr Gln Leu Leu Lys Asp Asn Leu Val Arg Ser
625 630 635 640

tac aac aag gcc ctc aag aag aac gcc ccc tac tcc atc ttc gcc atc 1968
Tyr Asn Lys Ala Leu Lys Lys Asn Ala Pro Tyr Ser Ile Phe Ala Ile
645 650 655

aag aac ggc ccc aag tcc cac atc ggt agg cac ctc atg acc tcc ttc 2016
Lys Asn Gly Pro Lys Ser His Ile Gly Arg His Leu Met Thr Ser Phe
660 665 670

ctc tca atg aag ggc ctc acc gag ctc acc aac gtg gtg ggc aac tgg 2064
Leu Ser Met Lys Gly Leu Thr Glu Leu Thr Asn Val Val Gly Asn Trp
675 680 685

tcc gac aag agg gcc tcc gcc gtg gcc agg acc acc tac acc cac cag 2112
Ser Asp Lys Arg Ala Ser Ala Val Ala Arg Thr Thr Tyr Thr His Gln
690 695 700

atc acc gcc atc ccc gac cac tac ttc gcc ctc gtg tca agg tac tac 2160
Ile Thr Ala Ile Pro Asp His Tyr Phe Ala Leu Val Ser Arg Tyr Tyr
705 710 715 720

gcc tac gac ccc atc tcc aag gag atg atc gcc ctc aag gac gag act 2208
Ala Tyr Asp Pro Ile Ser Lys Glu Met Ile Ala Leu Lys Asp Glu Thr
725 730 735

aac ccc atc gag gag tgg cag cac atc gag cag ctc aag ggc tcc gcc 2256
Asn Pro Ile Glu Glu Trp Gln His Ile Glu Gln Leu Lys Gly Ser Ala
740 745 750

gag ggc tcc atc agg tac ccc gcc tgg aac ggc atc atc tcc cag gag 2304
Glu Gly Ser Ile Arg Tyr Pro Ala Trp Asn Gly Ile Ile Ser Gln Glu
755 760 765

gtg ctc gac tac ctc tcc tcc tac atc aac agg agg atc tga 2346
Val Leu Asp Tyr Leu Ser Ser Tyr Ile Asn Arg Arg Ile
770 775 780

<210> 6
<211> 781
<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz,
die für moCre:FLPm codiert, Cre aus Bakteriophage
P1 und FLP aus Saccharomyces, beide Mais-
bevorzugte Codons

<400> 6

```

Met Ser Asn Leu Leu Thr Val His Gln Asn Leu Pro Ala Leu Pro Val
 1          5          10          15
Asp Ala Thr Ser Asp Glu Val Arg Lys Asn Leu Met Asp Met Phe Arg
 20          25          30
Asp Arg Gln Ala Phe Ser Glu His Thr Trp Lys Met Leu Leu Ser Val
 35          40          45
Cys Arg Ser Trp Ala Ala Trp Cys Lys Leu Asn Asn Arg Lys Trp Phe
 50          55          60
Pro Ala Glu Pro Glu Asp Val Arg Asp Tyr Leu Leu Tyr Leu Gln Ala
 65          70          75          80
Arg Gly Leu Ala Val Lys Thr Ile Gln Gln His Leu Gly Gln Leu Asn
 85          90          95
Met Leu His Arg Arg Ser Gly Leu Pro Arg Pro Ser Asp Ser Asn Ala
 100         105         110
Val Ser Leu Val Met Arg Arg Ile Arg Lys Glu Asn Val Asp Ala Gly
 115         120         125
Glu Arg Ala Lys Gln Ala Leu Ala Phe Glu Arg Thr Asp Phe Asp Gln
 130         135         140
Val Arg Ser Leu Met Glu Asn Ser Asp Arg Cys Gln Asp Ile Arg Asn
 145         150         155         160
Leu Ala Phe Leu Gly Ile Ala Tyr Asn Thr Leu Leu Arg Ile Ala Glu
 165         170         175
Ile Ala Arg Ile Arg Val Lys Asp Ile Ser Arg Thr Asp Gly Gly Arg
 180         185         190
Met Leu Ile His Ile Gly Arg Thr Lys Thr Leu Val Ser Thr Ala Gly
 195         200         205
Val Glu Lys Ala Leu Ser Leu Gly Val Thr Lys Leu Val Glu Arg Trp
 210         215         220
Ile Ser Val Ser Gly Val Ala Asp Asp Pro Asn Asn Tyr Leu Phe Cys
 225         230         235         240
Arg Val Arg Lys Asn Gly Val Ala Ala Pro Ser Ala Thr Ser Gln Leu
 245         250         255
Ser Thr Arg Ala Leu Glu Gly Ile Phe Glu Ala Thr His Arg Leu Ile
 260         265         270
Tyr Gly Ala Lys Asp Asp Ser Gly Gln Arg Tyr Leu Ala Trp Ser Gly
 275         280         285
His Ser Ala Arg Val Gly Ala Ala Arg Asp Met Ala Arg Ala Gly Val
 290         295         300
Ser Ile Pro Glu Ile Met Gln Ala Gly Gly Trp Thr Asn Val Asn Ile
 305         310         315         320
Val Met Asn Tyr Ile Arg Asn Leu Asp Ser Glu Thr Gly Ala Met Val
 325         330         335
Arg Leu Leu Glu Asp Gly Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 340         345         350
Gly Gly Ser Asp Pro Thr Met Pro Gln Phe Asp Ile Leu Cys Lys Thr
 355         360         365
Pro Pro Lys Val Leu Val Arg Gln Phe Val Glu Arg Phe Glu Arg Pro
 370         375         380
Ser Gly Glu Lys Ile Ala Leu Cys Ala Ala Glu Leu Thr Tyr Leu Cys

```

385					390					395					400
Trp	Met	Ile	Thr	His	Asn	Gly	Thr	Ala	Ile	Lys	Arg	Ala	Thr	Phe	Met
				405					410					415	
Ser	Tyr	Asn	Thr	Ile	Ile	Ser	Asn	Ser	Leu	Ser	Phe	Asp	Ile	Val	Asn
			420					425					430		
Lys	Ser	Leu	Gln	Phe	Lys	Tyr	Lys	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Ile	Leu	Glu
		435					440					445			
Ala	Ser	Leu	Lys	Lys	Leu	Ile	Pro	Ala	Trp	Glu	Phe	Thr	Ile	Ile	Pro
		450				455					460				
Tyr	Tyr	Gly	Gln	Lys	His	Gln	Ser	Asp	Ile	Thr	Asp	Ile	Val	Ser	Ser
465					470					475					480
Leu	Gln	Leu	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Glu	Glu	Ala	Asp	Lys	Gly	Asn	Ser
				485				490						495	
His	Ser	Lys	Lys	Met	Leu	Lys	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Gly	Glu	Ser	Ile
			500					505					510		
Trp	Glu	Ile	Thr	Glu	Lys	Ile	Leu	Asn	Ser	Phe	Glu	Tyr	Thr	Ser	Arg
		515					520						525		
Phe	Thr	Lys	Thr	Lys	Thr	Leu	Tyr	Gln	Phe	Leu	Phe	Leu	Ala	Thr	Phe
		530				535				540					
Ile	Asn	Cys	Gly	Arg	Phe	Ser	Asp	Ile	Lys	Asn	Val	Asp	Pro	Lys	Ser
545					550					555					560
Phe	Lys	Leu	Val	Gln	Asn	Lys	Tyr	Leu	Gly	Val	Ile	Ile	Gln	Cys	Leu
				565				570						575	
Val	Thr	Glu	Thr	Lys	Thr	Ser	Val	Ser	Arg	His	Ile	Tyr	Phe	Phe	Ser
			580					585					590		
Ala	Arg	Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Leu	Val	Tyr	Leu	Asp	Glu	Phe	Leu	Arg
		595					600					605			
Asn	Ser	Glu	Pro	Val	Leu	Lys	Arg	Val	Asn	Arg	Thr	Gly	Asn	Ser	Ser
	610					615					620				
Ser	Asn	Lys	Gln	Glu	Tyr	Gln	Leu	Leu	Lys	Asp	Asn	Leu	Val	Arg	Ser
625					630					635					640
Tyr	Asn	Lys	Ala	Leu	Lys	Lys	Asn	Ala	Pro	Tyr	Ser	Ile	Phe	Ala	Ile
				645				650						655	
Lys	Asn	Gly	Pro	Lys	Ser	His	Ile	Gly	Arg	His	Leu	Met	Thr	Ser	Phe
			660					665					670		
Leu	Ser	Met	Lys	Gly	Leu	Thr	Glu	Leu	Thr	Asn	Val	Val	Gly	Asn	Trp
		675					680						685		
Ser	Asp	Lys	Arg	Ala	Ser	Ala	Val	Ala	Arg	Thr	Thr	Tyr	Thr	His	Gln
	690					695					700				
Ile	Thr	Ala	Ile	Pro	Asp	His	Tyr	Phe	Ala	Leu	Val	Ser	Arg	Tyr	Tyr
705					710					715					720
Ala	Tyr	Asp	Pro	Ile	Ser	Lys	Glu	Met	Ile	Ala	Leu	Lys	Asp	Glu	Thr
				725					730					735	
Asn	Pro	Ile	Glu	Glu	Trp	Gln	His	Ile	Glu	Gln	Leu	Lys	Gly	Ser	Ala
			740					745					750		
Glu	Gly	Ser	Ile	Arg	Tyr	Pro	Ala	Trp	Asn	Gly	Ile	Ile	Ser	Gln	Glu
		755					760						765		
Val	Leu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Ser	Tyr	Ile	Asn	Arg	Arg	Ile			
	770					775					780				

<210> 7

<211> 2346

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz, die für ein Cre:FLP-Polypeptid codiert, Cre aus Bakteriophage P1 und FLP aus Saccharomyces

<400> 7

```

atggccaatt tactgaccgt acacccaaaat ttgcctgcat taccggtdga tgcaacgagt 60
gatgaggttc gcaagaacct gatggacatg ttcagggatc gccaggcgtt ttctgagcat 120
acctggaaaa tgcttctgtc cgtttgccgg tctggggcgg catggtgcaa gttgaataac 180
cggaaatggt ttcccgcaga acctgaagat gttcgcgatt atcttctata tcttcaggcg 240
cgcggtctgg cagtaaaaac tatccagcaa catttgggcc agctaaacat gcttcatcgt 300
cggtcggggc tgccacgacc aagtgcagc aatgctggtt cactggttat gggcgggatc 360
cgaaaagaaa acgttgatgc cggggaacgt gcaaaaacagg ctctagcgtt cgaacgcact 420
gatttcgacc aggttcgttc actcatggaa aatagcgatc gctgccagga tatacgtaat 480
ctggcatttc tggggattgc ttataacacc ctggtacgta tagccgaaat tgccaggatc 540
agggttaaag atatctcacg tactgacggg gggagaatgt taatccatat tggcagaacg 600
aaaacgctgg ttagcaccgc aggtgtagag aaggcactta gcctgggggt aactaaactg 660
gtcagcgcgt ggatttccgt ctctgggtgta gctgatgatc cgaataacta cctgttttgc 720
cgggtcagaa aaaatgggtg tgccgcgcca tctgccacca gccagctatc aactcgcgcc 780
ctggaagggg tttttgaagc aactcatcga ttgatttacg gcgctaagga tgactctggg 840
cagagatacc tggcctggtc tggacacagt gcccggtgctg gagccgcgcg agatatggcc 900
cgcgctggag tttcaabacc ggagatcatg caagctgggtg gctggaccaa tghtaatatt 960
gtcatgaact atatccgtaa cctggatagt gaaacagggg caatgggtgc cctgctggaa 1020
gatggcgatg gtggcggcag cgggtggcggc tccggcgggtg gctcggatcc aacaatgcca 1080
caatttgata tattatgtaa aacaccacct aaggctgcttg tctgtcagtt tgtggaaagg 1140
tttgagagac ctcccgga gaaaatagca ttatgtgctg ctgaactaac ctatttatgt 1200
tggatgatta cacataacgg aacagcactc aagagagcca cattcatgag ctataaact 1260
atcataagca attcgcctgag tttggatata gtcaacaagt cactgcagtt taaatacaag 1320
acgcaaaaag caacaattct ggaagcctca ttaaagaaat tgattcctgc ttgggaattt 1380
acaattattc ctactatgg acaaaaacat caatctgata tcaactgatat tgtaagttagt 1440
ttgcaattac agttcgaatc atcggaaagaa gcagataagg gaaatagcca cagtaaaaaa 1500
atgcttaaag cacttctaag tgagggtgaa agcatctggg agatcactga gaaaatacta 1560
aattcgtttg agtatacttc gagatttaca aaaacaaaaa ctttatacca attcctcttc 1620
ctagctactt tcatcaattg tgggaagattc agcgatatta agaacgttga tccgaaatca 1680
tttaaattag tccaaaataa gtatctggga gtaataatcc agtgttttagt gacagagaca 1740
aagacaagcg ttagtaggca catatacttc tttagcgcaa ggggtaggat cgatccactt 1800
gtatatttgg atgaattttt gaggaattct gaaccagctc taaaacgagt aataggac 1860
ggcaattctt caagcaacaa gcaggaatac caattattaa aagataactt agtcagatcg 1920
tacaacaaaag ctttgaagaa aaatgcgcct tattcaatct ttgctataaa aatggccca 1980
aaatctcaca ttggaagaca tttgatgacc tcatttcttt caatgaaggg cctaacggag 2040
ttgactaatg ttgtgggaaa ttggagcgat aagcgtgctt ctgccgtggc caggacaacg 2100
tatactcatc agataacagc aatacctgat cactacttcg cactagtttc tgggtactat 2160
gcatatgatc caatatcaaa ggaaatgata gcattgaagg atgagactaa tccaattgag 2220
gagtggcagc atatagaaca gctaaagggg agtgcgtaag gaagcatacg ataccccgca 2280
tggaatggga taatatcaca ggaggtaacta gactacctt catcctacat aatagacgc 2340
atataa 2346

```

<210> 8

<211> 2346

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz, die für ein FLPm:Cre-Polypeptid codiert, FLP aus

Saccharomyces (Mais-bevorzugte Codons)
und Cre aus Bakteriophage P1

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2346)

<400> 8

```

atg ccc cag ttc gac atc ctc tgc aag acc ccc ccc aag gtg ctc gtg 48
Met Pro Gln Phe Asp Ile Leu Cys Lys Thr Pro Pro Lys Val Leu Val
  1                    5                10                15

agg cag ttc gtg gag agg ttc gag agg ccc tcc ggc gag aag atc gcc 96
Arg Gln Phe Val Glu Arg Phe Glu Arg Pro Ser Gly Glu Lys Ile Ala
      20                25                30

ctc tgc gcc gcc gag ctc acc tac ctc tgc tgg atg atc acc cac aac 144
Leu Cys Ala Ala Glu Leu Thr Tyr Leu Cys Trp Met Ile Thr His Asn
      35                40                45

ggc acc gcc att aag agg gcc acc ttc atg tca tac aac acc atc atc 192
Gly Thr Ala Ile Lys Arg Ala Thr Phe Met Ser Tyr Asn Thr Ile Ile
      50                55                60

tcc aac tcc ctc tcc ttc gac atc gtg aac aag tcc ctc cag ttc aaa 240
Ser Asn Ser Leu Ser Phe Asp Ile Val Asn Lys Ser Leu Gln Phe Lys
      65                70                75                80

tac aag acc cag aag gcc acc atc ctc gag gcc tcc ctc aag aag ctc 288
Tyr Lys Thr Gln Lys Ala Thr Ile Leu Glu Ala Ser Leu Lys Lys Leu
      85                90                95

atc ccc gcc tgg gag ttc acc atc atc ccc tac tac ggc cag aag cac 336
Ile Pro Ala Trp Glu Phe Thr Ile Ile Pro Tyr Tyr Gly Gln Lys His
      100                105                110

cag tcc gac atc acc gac atc gtg tca tcc ctc cag ctt cag ttc gag 384
Gln Ser Asp Ile Thr Asp Ile Val Ser Ser Leu Gln Leu Gln Phe Glu
      115                120                125

tcc tcc gag gag gct gac aag ggc aac tcc cac tcc aag aag atg ctg 432
Ser Ser Glu Glu Ala Asp Lys Gly Asn Ser His Ser Lys Lys Met Leu
      130                135                140

aag gcc ctc ctc tcc gag ggc gag tcc atc tgg gag atc acc gag aag 480
Lys Ala Leu Leu Ser Glu Gly Glu Ser Ile Trp Glu Ile Thr Glu Lys
      145                150                155                160

atc ctc aac tcc ttc gag tac acc tcc agg ttc act aag acc aag acc 528
Ile Leu Asn Ser Phe Glu Tyr Thr Ser Arg Phe Thr Lys Thr Lys Thr
      165                170                175

ctc tac cag ttc ctc ttc ctc gcc acc ttc atc aac tgc ggc agg ttc 576
Leu Tyr Gln Phe Leu Phe Leu Ala Thr Phe Ile Asn Cys Gly Arg Phe
      180                185                190

```

tca gac atc aag aac gtg gac ccc aag tcc ttc aag ctc gtg cag aac	624
Ser Asp Ile Lys Asn Val Asp Pro Lys Ser Phe Lys Leu Val Gln Asn	
195 200 205	
aag tac ctc ggc gtg atc atc cag tgc ctc gtg acc gag acc aag acc	672
Lys Tyr Leu Gly Val Ile Ile Gln Cys Leu Val Thr Glu Thr Lys Thr	
210 215 220	
tcc gtg tcc agg cac atc tac ttc ttc tcc gct cgc ggc agg atc gac	720
Ser Val Ser Arg His Ile Tyr Phe Phe Ser Ala Arg Gly Arg Ile Asp	
225 230 235 240	
ccc ctc gtg tac ctc gac gag ttc ctc agg aac tca gag ccc gtg ctc	768
Pro Leu Val Tyr Leu Asp Glu Phe Leu Arg Asn Ser Glu Pro Val Leu	
245 250 255	
aag agg gtg aac agg acc ggc aac tcc tcc tcc aac aag cag gag tac	816
Lys Arg Val Asn Arg Thr Gly Asn Ser Ser Ser Asn Lys Gln Glu Tyr	
260 265 270	
cag ctc ctc aag gac aac ctc gtg agg tcc tac aac aag gcc ctc aag	864
Gln Leu Leu Lys Asp Asn Leu Val Arg Ser Tyr Asn Lys Ala Leu Lys	
275 280 285	
aag aac gcc ccc tac tcc atc ttc gcc atc aag aac ggc ccc aag tcc	912
Lys Asp Ala Pro Tyr Ser Ile Phe Ala Ile Lys Asn Gly Pro Lys Ser	
290 295 300	
cac atc ggt agg cac ctc atg acc tcc ttc ctc tca atg aag ggc ctc	960
His Ile Gly Arg His Leu Met Thr Ser Phe Leu Ser Met Lys Gly Leu	
305 310 315 320	
acc gag ctc acc aac gtg gtg ggc aac tgg tcc gac aag agg gcc tcc	1008
Thr Glu Leu Thr Asn Val Val Gly Asn Trp Ser Asp Lys Arg Ala Ser	
325 330 335	
gcc gtg gcc agg acc acc tac acc cac cag atc acc gcc atc ccc gac	1056
Ala Val Ala Arg Thr Thr Tyr Thr His Gln Ile Thr Ala Ile Pro Asp	
340 345 350	
cac tac ttc gcc ctc gtg tca agg tac tac gcc tac gac ccc atc tcc	1104
His Tyr Phe Ala Leu Val Ser Arg Tyr Tyr Ala Tyr Asp Pro Ile Ser	
355 360 365	
aag gag atg atc gcc ctc aag gac gag act aac ccc atc gag gag tgg	1152
Lys Glu Met Ile Ala Leu Lys Asp Glu Thr Asn Pro Ile Glu Glu Trp	
370 375 380	
cag cac atc gag cag ctc aag ggc tcc gcc gag ggc tcc atc agg tac	1200
Gln His Ile Glu Gln Leu Lys Gly Ser Ala Glu Gly Ser Ile Arg Tyr	
385 390 395 400	
ccc gcc tgg aac ggc atc atc tcc cag gag gtg ctc gac tac ctc tcc	1248
Pro Ala Trp Asn Gly Ile Ile Ser Gln Glu Val Leu Asp Tyr Leu Ser	
405 410 415	

tcc tac atc aac agg agg atc ggt ggc ggc agc ggt ggc ggc tcc ggc	1296
Ser Tyr Ile Asn Arg Arg Ile Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly	
420 425 430	
ggc ggc tcg gat cca acc atg gcc aat tta ctg acc gta cac caa aat	1344
Gly Gly Ser Asp Pro Thr Met Ala Asn Leu Leu Thr Val His Gln Asn	
435 440 445	
ttg cct gca tta ccg gtc gat gca acg agt gat gag gtt cgc aag aac	1392
Leu Pro Ala Leu Pro Val Asp Ala Thr Ser Asp Glu Val Arg Lys Asn	
450 455 460	
ctg atg gac atg ttc agg gat cgc cag gcg ttt tct gag cat acc tgg	1440
Leu Met Asp Met Phe Arg Asp Arg Gln Ala Phe Ser Glu His Thr Trp	
465 470 475 480	
aaa atg ctt ctg tcc gtt tgc cgg tcg tgg gcg gca tgg tgc aag ttg	1488
Lys Met Leu Leu Ser Val Cys Arg Ser Trp Ala Ala Trp Cys Lys Leu	
485 490 495	
aat aac cgg aaa tgg ttt ccc gca gaa cct gaa gat gtt cgc gat tat	1536
Asn Asn Arg Lys Trp Phe Pro Ala Glu Pro Glu Asp Val Arg Asp Tyr	
500 505 510	
ctt cta tat ctt cag gcg cgc ggt ctg gca gta aaa act atc cag caa	1584
Leu Leu Tyr Leu Gln Ala Arg Gly Leu Ala Val Lys Thr Ile Gln Gln	
515 520 525	
cat ttg ggc cag cta aac atg ctt cat cgt cgg tcc ggg ctg cca cga	1632
His Leu Gly Gln Leu Asn Met Leu His Arg Arg Ser Gly Leu Pro Arg	
530 535 540	
cca agt gac agc aat gct gtt tca ctg gtt atg cgg cgg atc cga aaa	1680
Pro Ser Asp Ser Asn Ala Val Ser Leu Val Met Arg Arg Ile Arg Lys	
545 550 555 560	
gaa aac gtt gat gcc ggt gaa cgt gca aaa cag gct cta gcg ttc gaa	1728
Glu Asn Val Asp Ala Gly Glu Arg Ala Lys Gln Ala Leu Ala Phe Glu	
565 570 575	
cgc act gat ttc gac cag gtt cgt tca ctc atg gaa aat agc gat cgc	1776
Arg Thr Asp Phe Asp Gln Val Arg Ser Leu Met Glu Asn Ser Asp Arg	
580 585 590	
tgc cag gat ata cgt aat ctg gca ttt ctg ggg att gct tat aac acc	1824
Cys Gln Asp Ile Arg Asn Leu Ala Phe Leu Gly Ile Ala Tyr Asn Thr	
595 600 605	
ctg tta cgt ata gcc gaa att gcc agg atc agg gtt aaa gat atc tca	1872
Leu Leu Arg Ile Ala Glu Ile Ala Arg Ile Arg Val Lys Asp Ile Ser	
610 615 620	
cgt act gac ggt ggg aga atg tta atc cat att ggc aga acg aaa acg	1920
Arg Thr Asp Gly Gly Arg Met Leu Ile His Ile Gly Arg Thr Lys Thr	
625 630 635 640	

```

ctg gtt agc acc gca ggt gta gag aag gca ctt agc ctg ggg gta act 1968
Leu Val Ser Thr Ala Gly Val Glu Lys Ala Leu Ser Leu Gly Val Thr
        645                650                655

aaa ctg gtc gag cga tgg att tcc gtc tct ggt gta gct gat gat ccg 2016
Lys Leu Val Glu Arg Trp Ile Ser Val Ser Gly Val Ala Asp Asp Pro
        660                665                670

aat aac tac ctg ttt tgc cgg gtc aga aaa aat ggt gtt gcc gcg cca 2064
Asn Asn Tyr Leu Phe Cys Arg Val Arg Lys Asn Gly Val Ala Ala Pro
        675                680                685

tct gcc acc agc cag cta tca act cgc gcc ctg gaa ggg att ttt gaa 2112
Ser Ala Thr Ser Gln Leu Ser Thr Arg Ala Leu Glu Gly Ile Phe Glu
        690                695                700

gca act cat cga ttg att tac ggc gct aag gat gat tct ggt cag aga 2160
Ala Thr His Arg Leu Ile Tyr Gly Ala Lys Asp Asp Ser Gly Gln Arg
        705                710                715                720

tac ctg gcc tgg tct gga cac agt gcc cgt gtc gga gcc gcg cga gat 2208
Tyr Leu Ala Trp Ser Gly His Ser Ala Arg Val Gly Ala Ala Arg Asp
        725                730                735

atg gcc cgc gct gga gtt tca ata ccg gag atc atg caa gct ggt ggc 2256
Met Ala Arg Ala Gly Val Ser Ile Pro Glu Ile Met Gln Ala Gly Gly
        740                745                750

tgg acc aat gta aat att gtc atg aac tat atc cgt aac ctg gat agt 2304
Trp Thr Asn Val Asn Ile Val Met Asn Tyr Ile Arg Asn Leu Asp Ser
        755                760                765

gaa aca ggg gca atg gtg cgc ctg ctg gaa gat gcc gat tag 2346
Glu Thr Gly Ala Met Val Arg Leu Leu Glu Asp Gly Asp
        770                775                780

```

<210> 9

<211> 781

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz, die für
FLPm:Cre-Polypeptid codiert, FLP aus Saccharomyces
(Mais-bevorzugte Codons) und Cre aus Bakteriophage P1

<400> 9

```

Met Pro Gln Phe Asp Ile Leu Cys Lys Thr Pro Pro Lys Val Leu Val
 1                5                10                15
Arg Gln Phe Val Glu Arg Phe Glu Arg Pro Ser Gly Glu Lys Ile Ala
        20                25                30
Leu Cys Ala Ala Glu Leu Thr Tyr Leu Cys Trp Met Ile Thr His Asn
        35                40                45
Gly Thr Ala Ile Lys Arg Ala Thr Phe Met Ser Tyr Asn Thr Ile Ile
        50                55                60
Ser Asn Ser Leu Ser Phe Asp Ile Val Asn Lys Ser Leu Gln Phe Lys

```

65					70					.75					80
Tyr	Lys	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Ile	Leu	Glu	Ala	Ser	Leu	Lys	Lys	Leu
				85					90						95
Ile	Pro	Ala	Trp	Glu	Phe	Thr	Ile	Ile	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Gln	Lys	His
			100					105					110		
Gln	Ser	Asp	Ile	Thr	Asp	Ile	Val	Ser	Ser	Leu	Gln	Leu	Gln	Phe	Glu
		115					120						125		
Ser	Ser	Glu	Glu	Ala	Asp	Lys	Gly	Asn	Ser	His	Ser	Lys	Lys	Met	Leu
		130				135						140			
Lys	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Gly	Glu	Ser	Ile	Trp	Glu	Ile	Thr	Glu	Lys
145					150					155					160
Ile	Leu	Asn	Ser	Phe	Glu	Tyr	Thr	Ser	Arg	Phe	Thr	Lys	Thr	Lys	Thr
				165					170						175
Leu	Tyr	Gln	Phe	Leu	Phe	Leu	Ala	Thr	Phe	Ile	Asn	Cys	Gly	Arg	Phe
			180					185						190	
Ser	Asp	Ile	Lys	Asn	Val	Asp	Pro	Lys	Ser	Phe	Lys	Leu	Val	Gln	Asn
		195				200						205			
Lys	Tyr	Leu	Gly	Val	Ile	Ile	Gln	Cys	Leu	Val	Thr	Glu	Thr	Lys	Thr
	210					215						220			
Ser	Val	Ser	Arg	His	Ile	Tyr	Phe	Phe	Ser	Ala	Arg	Gly	Arg	Ile	Asp
225					230					235					240
Pro	Leu	Val	Tyr	Leu	Asp	Glu	Phe	Leu	Arg	Asn	Ser	Glu	Pro	Val	Leu
				245					250					255	
Lys	Arg	Val	Asn	Arg	Thr	Gly	Asn	Ser	Ser	Ser	Asn	Lys	Gln	Glu	Tyr
			260					265					270		
Gln	Leu	Leu	Lys	Asp	Asn	Leu	Val	Arg	Ser	Tyr	Asn	Lys	Ala	Leu	Lys
		275					280						285		
Lys	Asn	Ala	Pro	Tyr	Ser	Ile	Phe	Ala	Ile	Lys	Asn	Gly	Pro	Lys	Ser
		290				295						300			
His	Ile	Gly	Arg	His	Leu	Met	Thr	Ser	Phe	Leu	Ser	Met	Lys	Gly	Leu
305					310					315					320
Thr	Glu	Leu	Thr	Asn	Val	Val	Gly	Asn	Trp	Ser	Asp	Lys	Arg	Ala	Ser
				325					330					335	
Ala	Val	Ala	Arg	Thr	Thr	Tyr	Thr	His	Gln	Ile	Thr	Ala	Ile	Pro	Asp
			340					345					350		
His	Tyr	Phe	Ala	Leu	Val	Ser	Arg	Tyr	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Pro	Ile	Ser
		355					360					365			
Lys	Glu	Met	Ile	Ala	Leu	Lys	Asp	Glu	Thr	Asn	Pro	Ile	Glu	Glu	Trp
	370					375					380				
Gln	His	Ile	Glu	Gln	Leu	Lys	Gly	Ser	Ala	Glu	Gly	Ser	Ile	Arg	Tyr
385					390					395					400
Pro	Ala	Trp	Asn	Gly	Ile	Ile	Ser	Gln	Glu	Val	Leu	Asp	Tyr	Leu	Ser
			405						410					415	
Ser	Tyr	Ile	Asn	Arg	Arg	Ile	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
			420				425						430		
Gly	Gly	Ser	Asp	Pro	Thr	Met	Ala	Asn	Leu	Leu	Thr	Val	His	Gln	Asn
		435					440					445			
Leu	Pro	Ala	Leu	Pro	Val	Asp	Ala	Thr	Ser	Asp	Glu	Val	Arg	Lys	Asn
	450					455					460				
Leu	Met	Asp	Met	Phe	Arg	Asp	Arg	Gln	Ala	Phe	Ser	Glu	His	Thr	Trp
465				470						475					480
Lys	Met	Leu	Leu	Ser	Val	Cys	Arg	Ser	Trp	Ala	Ala	Trp	Cys	Lys	Leu
				485					490					495	
Asn	Asn	Arg	Lys	Trp	Phe	Pro	Ala	Glu	Pro	Glu	Asp	Val	Arg	Asp	Tyr
			500					505					510		
Leu	Leu	Tyr	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Leu	Ala	Val	Lys	Thr	Ile	Gln	Gln

Polypeptid, Cre aus Bakteriophage P1 und FLP
aus Saccharomyces

<400> 11

Met Ala Asn Leu Leu Thr Val His Gln Asn Leu Pro Ala Leu Pro Val
 1 5 10 15
 Asp Ala Thr Ser Asp Glu Val Arg Lys Asn Leu Met Asp Met Phe Arg
 20 25 30
 Asp Arg Gln Ala Phe Ser Glu His Thr Trp Lys Met Leu Leu Ser Val
 35 40 45
 Cys Arg Ser Trp Ala Ala Trp Cys Lys Leu Asn Asn Arg Lys Trp Phe
 50 55 60
 Pro Ala Glu Pro Glu Asp Val Arg Asp Tyr Leu Leu Tyr Leu Gln Ala
 65 70 75 80
 Arg Gly Leu Ala Val Lys Thr Ile Gln Gln His Leu Gly Gln Leu Asn
 85 90 95
 Met Leu His Arg Arg Ser Gly Leu Pro Arg Pro Ser Asp Ser Asn Ala
 100 105 110
 Val Ser Leu Val Met Arg Arg Ile Arg Lys Glu Asn Val Asp Ala Gly
 115 120 125
 Glu Arg Ala Lys Gln Ala Leu Ala Phe Glu Arg Thr Asp Phe Asp Gln
 130 135 140
 Val Arg Ser Leu Met Glu Asn Ser Asp Arg Cys Gln Asp Ile Arg Asn
 145 150 155 160
 Leu Ala Phe Leu Gly Ile Ala Tyr Asn Thr Leu Leu Arg Ile Ala Glu
 165 170 175
 Ile Ala Arg Ile Arg Val Lys Asp Ile Ser Arg Thr Asp Gly Gly Arg
 180 185 190
 Met Leu Ile His Ile Gly Arg Thr Lys Thr Leu Val Ser Thr Ala Gly
 195 200 205
 Val Glu Lys Ala Leu Ser Leu Gly Val Thr Lys Leu Val Glu Arg Trp
 210 215 220
 Ile Ser Val Ser Gly Val Ala Asp Asp Pro Asn Asn Tyr Leu Phe Cys
 225 230 235 240
 Arg Val Arg Lys Asn Gly Val Ala Ala Pro Ser Ala Thr Ser Gln Leu
 245 250 255
 Ser Thr Arg Ala Leu Glu Gly Ile Phe Glu Ala Thr His Arg Leu Ile
 260 265 270
 Tyr Gly Ala Lys Asp Asp Ser Gly Gln Arg Tyr Leu Ala Trp Ser Gly

Val Thr Glu Thr Lys Thr Ser Val Ser Arg His Ile Tyr Phe Phe Ser
 580 585 590
 Ala Arg Gly Arg Ile Asp Pro Leu Val Tyr Leu Asp Glu Phe Leu Arg
 595 600 605
 Asn Ser Glu Pro Val Leu Lys Arg Val Asn Arg Thr Gly Asn Ser Ser
 610 615 620
 Ser Asn Lys Gln Glu Tyr Gln Leu Leu Lys Asp Asn Leu Val Arg Ser
 625 630 635 640
 Tyr Asn Lys Ala Leu Lys Lys Asn Ala Pro Tyr Ser Ile Phe Ala Ile
 645 650 655
 Lys Asn Gly Pro Lys Ser His Ile Gly Arg His Leu Met Thr Ser Phe
 660 665 670
 Leu Ser Met Lys Gly Leu Thr Glu Leu Thr Asn Val Val Gly Asn Trp
 675 680 685
 Ser Asp Lys Arg Ala Ser Ala Val Ala Arg Thr Thr Tyr Thr His Gln
 690 695 700
 Ile Thr Ala Ile Pro Asp His Tyr Phe Ala Leu Val Ser Arg Tyr Tyr
 705 710 715 720
 Ala Tyr Asp Pro Ile Ser Lys Glu Met Ile Ala Leu Lys Asp Glu Thr
 725 730 735
 Asn Pro Ile Glu Glu Trp Gln His Ile Glu Gln Leu Lys Gly Ser Ala
 740 745 750
 Glu Gly Ser Ile Arg Tyr Pro Ala Trp Asn Gly Ile Ile Ser Gln Glu
 755 760 765
 Val Leu Asp Tyr Leu Ser Ser Tyr Ile Asn Arg Arg Ile
 770 775 780

Patentansprüche

1. Rekombinantes Protein, umfassend eine erste ortsspezifische Rekombinase im Raster fusioniert mit einer zweiten unterschiedlichen ortsspezifischen Rekombinase.
2. Rekombinantes Protein nach Anspruch 1, wobei die erste und die zweite unterschiedliche ortsspezifische Rekombinase Glieder der Integrasefamilie von Rekombinasen, ein aktives Derivat eines Glieds der Integrasefamilie von Rekombinasen oder ein aktives Fragment eines Glieds der Integrasefamilie von Rekombinasen sind, wobei die Rekombinase, das aktive Derivat oder das aktive Fragment eine konservative ortsspezifische Rekombination katalysiert.
3. Rekombinantes Protein nach Anspruch 2, wobei die erste und die zweite unterschiedliche Rekombinase ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Cre, FLP, einem aktiven Derivat von Cre und einem aktiven Fragment von Cre, einem aktiven Fragment von FLP und einem aktiven Derivat von FLP, wobei die Rekombinase, das aktive Fragment oder das aktive Derivat eine konservative ortsspezifische Rekombination katalysiert.
4. Rekombinantes Protein, das die Aminosäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOS : 3, 6, 9 und 11, umfasst.
5. Nukleinsäuremolekül, das eine Nukleotidsequenz, die für eine erste ortsspezifische Rekombinase im Raster fusioniert mit einer zweiten unterschiedlichen ortsspezifischen Rekombinase codiert, umfasst.

6. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 5, wobei die Nukleotidsequenz für die erste und die unterschiedliche zweite ortsspezifische Rekombinase nach Anspruch 2, 3 oder 4 codiert.
7. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 6, wobei die erste oder zweite unterschiedliche Rekombinase Cre oder FLP umfasst, wobei die Cre-Rekombinase durch SEQ ID NO: 2, ein aktives Fragment von SEQ ID NO: 2 oder ein aktives Derivat von SEQ ID NO: 2 codiert wird und die FLP-Rekombinase durch FLPm, ein aktives Fragment von FLPm oder ein aktives Derivat von FLPm codiert wird, wobei das aktive Fragment oder Derivat für eine Rekombinase codiert, die fähig ist, ein konservatives, ortsspezifisches Rekombinationsereignis zu katalysieren.
8. Nukleinsäuremolekül, das SEQ ID NO: 2, 4, 5, 7 oder 8 umfasst.
9. Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 5 bis 8, wobei das Molekül funktionell mit einem Promotor verknüpft ist, der eine Expression in einer eukaryotischen Zelle steuert.
10. Eukaryotische Zelle, die das Nukleinsäuremolekül, wie es in einem der Ansprüche 5 bis 9 definiert ist, stabil in ihr Genom eingebaut hat.
11. Eukaryotische Zelle nach Anspruch 10, wobei die Zelle eine Pflanzenzelle ist.
12. Eukaryotische Zelle nach Anspruch 11, wobei die Pflanzenzelle aus einer Monokotyle stammt.
13. Eukaryotische Zelle nach Anspruch 12, wobei die Monokotyle Mais, Weizen, Reis, Gerste, Sorghum oder Roggen ist.
14. Eukaryotische Zelle nach Anspruch 11, wobei die Zelle aus einer Dikotyle stammt.
15. Eukaryotische Zelle nach Anspruch 14, wobei die Dikotyle Sojabohne, Brassica, Sonnenblume oder Saflor ist.
16. Pflanze, die in ein Chromosom wenigstens eine Integrationsstelle, die eine Targetstelle für eine erste ortsspezifische Rekombinase und eine Targetstelle für eine zweite unterschiedliche ortsspezifische Rekombinase umfasst, stabil integriert hat, wobei die Targetstellen aneinander angrenzend sind.
17. Pflanze nach Anspruch 16, wobei die Pflanze eine Monokotyle ist.
18. Pflanze nach Anspruch 17, wobei die Monokotyle Mais, Weizen, Reis, Gerste, Sorghum oder Roggen ist.
19. Pflanze nach Anspruch 16, wobei die Pflanze eine Dikotyle ist.
20. Pflanze nach Anspruch 19, wobei die Dikotyle Sojabohne, Brassica, Sonnenblume, Alfalfa oder Saflor ist.
21. Transformierter Samen aus der Pflanze nach einem der Ansprüche 16 bis 20.
22. Pflanze nach einem der Ansprüche 16 bis 20, wobei die Pflanze eine Pflanzenzelle ist.
23. Verfahren zum Integrieren einer DNA von Interesse in das Genom einer eukaryotischen Zelle, umfassend:
 - (a) Einführen einer Transferkassette, die die DNA von Interesse umfasst, in die eukaryotische Zelle, wobei die DNA von Interesse von einer Targetstelle für eine erste ortsspezifische Rekombinase und einer Targetstelle für eine zweite unterschiedliche ortsspezifische Rekombinase flankiert wird und das Genom der eukaryotischen Zelle wenigstens eine Integrationsstelle umfasst, die Targetstellen umfasst, welche den Targetstellen entsprechen, die die DNA von Interesse flankieren; und
 - (b) Bereitstellen in der genannten eukaryotischen Zelle ein rekombinantes Protein, das die erste Rekombinase, ein aktives Derivat der ersten Rekombinase oder ein aktives Fragment der ersten Rekombinase im Raster fusioniert mit der zweiten unterschiedlichen Rekombinase, einem aktiven Derivat der zweiten unterschiedlichen Rekombinase oder einem aktiven Fragment der zweiten unterschiedlichen Rekombinase umfasst, wobei die erste und die zweite Rekombinase, das aktive Derivat oder das aktive Fragment ein konservatives ortsspezi-

fisches Rekombinationsereignis katalysiert,
wobei die DNA von Interesse an der Integrationsstelle in das Genom integriert wird.

24. Verfahren zum Integrieren einer DNA von Interesse in das Genom einer eukaryotischen Zelle, umfassend:

(a) Einführen einer Transferkassette, die die DNA von Interesse umfasst, in die eukaryotische Zelle, wobei die DNA von Interesse durch eine Targetstelle für eine erste ortsspezifische Rekombinase und eine Targetstelle für eine zweite unterschiedliche ortsspezifische Rekombinase flankiert wird und das Genom der eukaryotischen Zelle wenigstens eine Integrationsstelle umfasst, die die Targetstellen umfasst, die den Targetstellen entsprechen, welche die DNA von Interesse flankieren; und

(b) Bereitstellen in der Zelle der ersten Rekombinase, eines aktiven Derivats der ersten Rekombinase oder eines aktiven Fragments der ersten Rekombinase und der zweiten unterschiedlichen Rekombinase, eines aktiven Derivats der zweiten Rekombinase oder eines aktiven Fragments der zweiten unterschiedlichen Rekombinase, wobei die erste und zweite Rekombinase, das aktive Derivat oder das aktive Fragment ein konservatives ortsspezifisches Rekombinationsereignis katalysiert.

25. Verfahren nach Anspruch 23 oder 24, wobei die eukaryotische Zelle eine Pflanzenzelle ist.

26. Verfahren nach Anspruch 25, wobei die Pflanzenzelle monokotyl oder dikotyl ist.

27. Verfahren nach Anspruch 26, wobei die monokotyle Pflanzenzelle aus Mais, Weizen, Reis, Gerste, Sorghum oder Roggen stammt und die dikotyle Pflanzenzelle aus Sojabohne, Brassica, Sonnenblume, Alfalfa oder Saflor stammt.

28. Verfahren nach Anspruch 23, 24 oder 25, wobei die erste Rekombinase Cre, ein aktives Derivat von Cre oder ein aktives Fragment von Cre ist und die zweite Rekombinase FLP, ein aktives Derivat von FLP oder ein aktives Fragment von FLP-Rekombinase ist, wobei die Rekombinase, das aktive Derivat oder das aktive Fragment ein konservatives ortsspezifisches Rekombinationsereignis katalysiert.

29. Verfahren nach Anspruch 28, wobei die erste ortsspezifische Rekombinase ein aktives Derivat von Cre umfasst.

30. Verfahren nach Anspruch 28, wobei die erste ortsspezifische Rekombinase ein aktives Fragment von Cre umfasst.

31. Verfahren nach Anspruch 28, wobei die erste ortsspezifische Rekombinase Cre umfasst.

32. Verfahren nach Anspruch 28, 29, 30 oder 31, wobei die zweite ortsspezifische Rekombinase ein aktives Derivat von FLP umfasst.

33. Verfahren nach Anspruch 28, 29, 30 oder 31, wobei die zweite ortsspezifische Rekombinase ein aktives Fragment von FLP umfasst.

34. Verfahren nach Anspruch 28, 29, 30 oder 31, wobei die zweite ortsspezifische Rekombinase FLP umfasst.

35. Verfahren nach Anspruch 34, wobei die erste ortsspezifische Rekombinase Cre umfasst und die zweite ortsspezifische Rekombinase FLP umfasst.

36. Verfahren nach Anspruch 28, 29, 30 oder 31, wobei die FLP-Rekombinase durch FLPm codiert wird.

37. Verfahren nach Anspruch 28, 29, 30 oder 31, wobei die Cre-Rekombinase durch SEQ ID NO: 2 codiert wird.

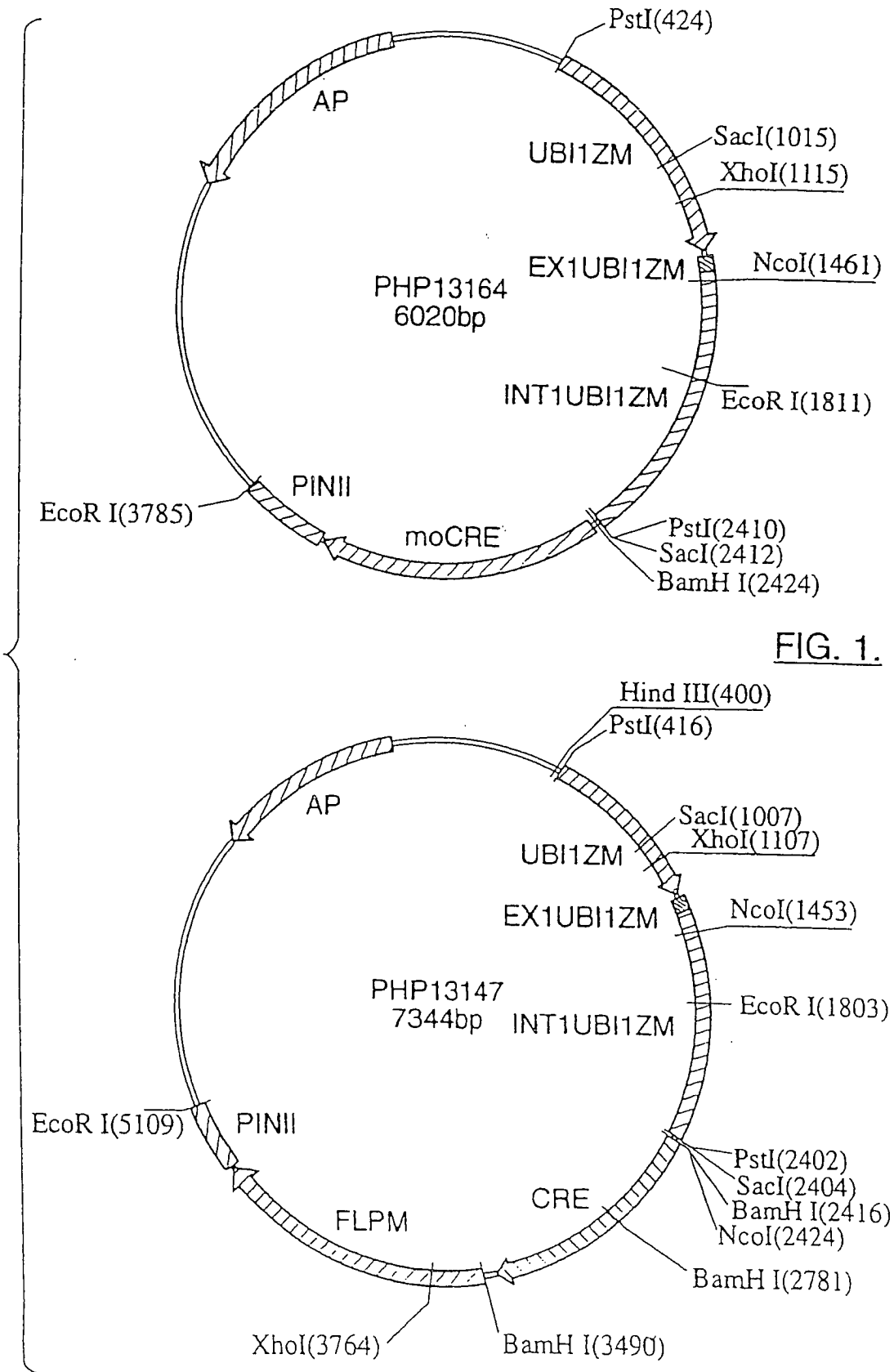
38. Verfahren nach Anspruch 23, wobei das rekombinante Protein durch SEQ ID NO: 4, 5, 7 oder 8 codiert wird.

39. Verfahren nach Anspruch 23, wobei die erste ortsspezifische Rekombinase an den Amino-Terminus der zweiten unterschiedlichen ortsspezifischen Rekombinase fusioniert ist.

40. Verfahren nach Anspruch 23, wobei die zweite unterschiedliche ortsspezifische Rekombinase an den Amino-Terminus der ersten ortsspezifischen Rekombinase fusioniert ist.
41. Pflanze, die in ihr Genom das Nukleinsäuremolekül, wie es in einem der Ansprüche 5 bis 9 definiert ist, stabil eingebaut hat.
42. Pflanze nach Anspruch 41, wobei die Pflanze eine Monokotyle ist.
43. Pflanze nach Anspruch 42, wobei die Monokotyle Mais, Weizen, Reis, Gerste, Sorghum oder Roggen ist.
44. Pflanze nach Anspruch 41, wobei die Pflanze aus einer Dikotyle ist.
45. Pflanze nach Anspruch 49, wobei die Dikotyle Sojabohne, Brassica, Sonnenblume, Alfalfa oder Saflor ist.
46. Transformierter Samen aus der Pflanze nach einem der Ansprüche 41 bis 45.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



EXZISION DER FRT-STELLE DURCH FLPm UND Cre-FLPm-FUSION

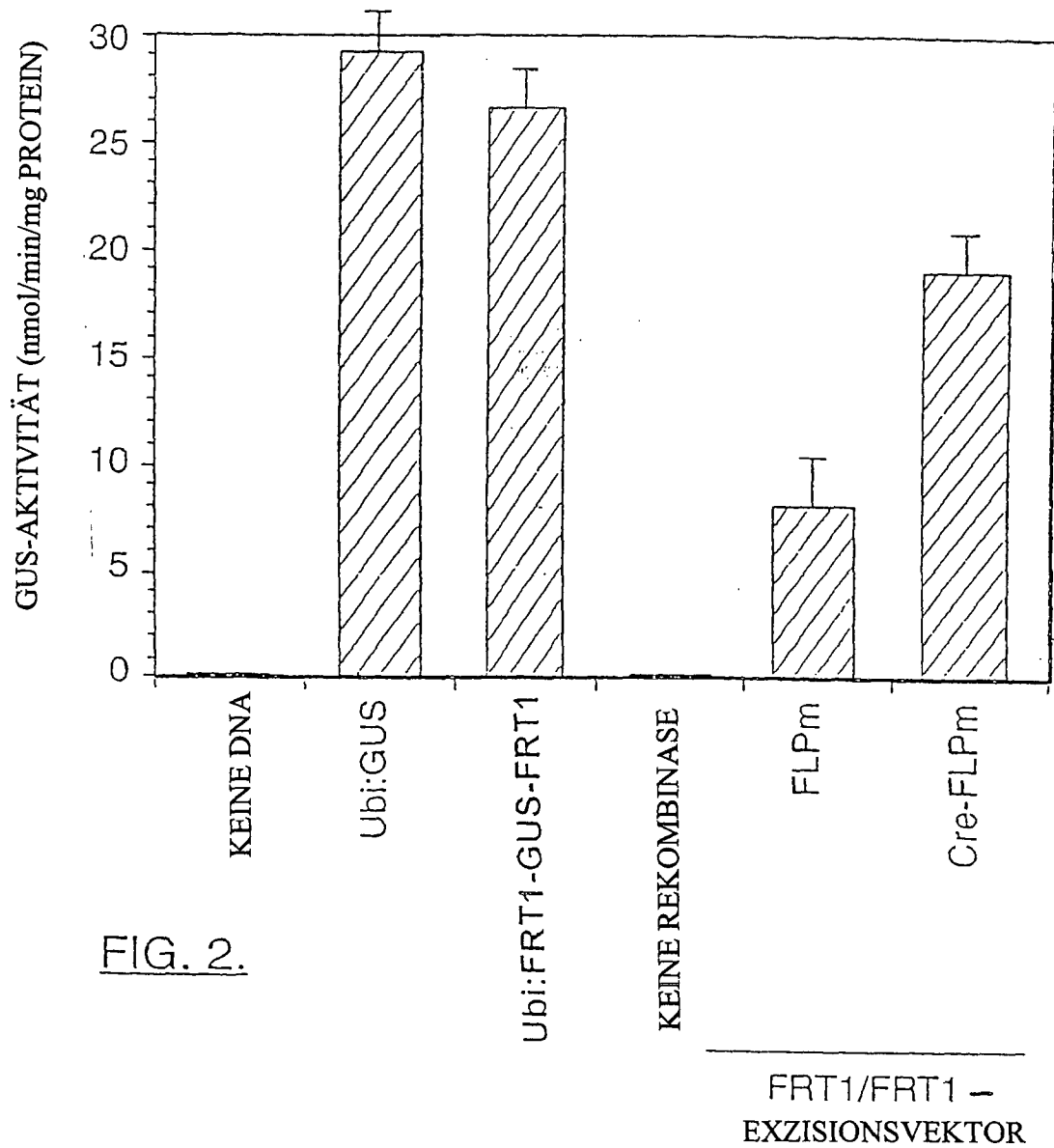


FIG. 2.

EXZISION DER LoxP-STELLE DURCH Cre-FLPm-FUSIONSPROTEIN

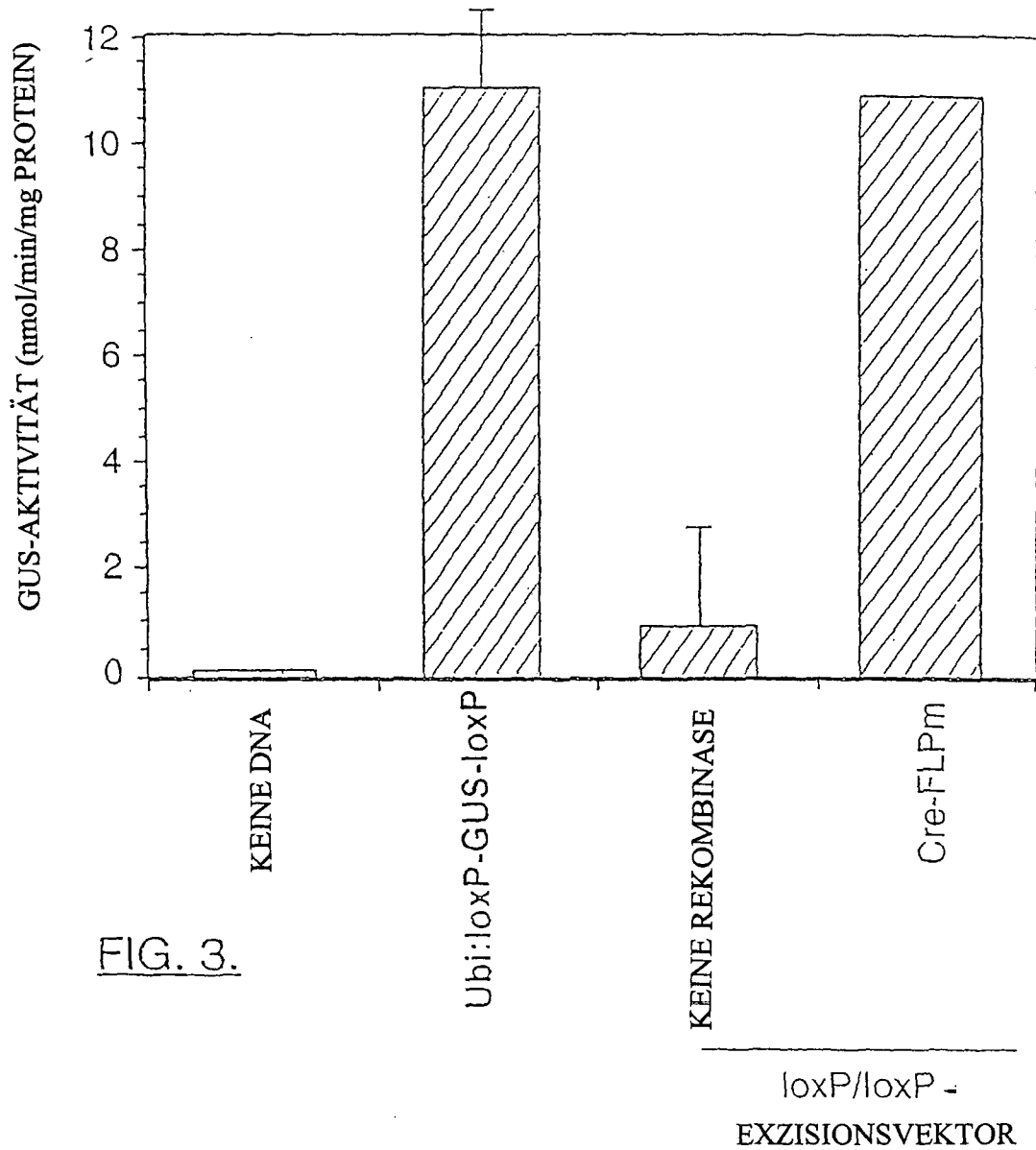


FIG. 3.