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

(10) **DE 695 34 621 T2** 2006.08.10

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 749 491 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 34 621.0**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/02901**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 913 608.6**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1995/024493**
(86) PCT-Anmeldetag: **10.03.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **14.09.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **27.12.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **16.11.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **10.08.2006**

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

(30) Unionspriorität:
209649 **11.03.1994** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Calgene LLC, Davis, Calif., US

(72) Erfinder:
McBRIDE, E., Kevin, Davis, US; STALKER, M., David, Davis, US

(74) Vertreter:
Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col., 50667 Köln

(54) Bezeichnung: **ERHÖHTE EXPRESSION IN PFLANZLICHEN PLASTIDEN**

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] Diese Erfindung bezieht sich auf die Anwendung von gentechnischen Methoden auf Pflanzen. Insbesondere bezieht sich die Erfindung auf Zusammensetzungen und Verfahren zur Verstärkung der Expression eines interessierenden Peptids im Plastid einer Pflanzenzelle.

Hintergrund

[0002] Plastiden höherer Pflanzen, d.h. Chloroplasten, Amyloplasten und Chromoplasten, haben denselben genetischen Gehalt, und daher glaubt man, dass sie von einem gemeinsamen Vorläufer, der als Proplastid bekannt ist, abstammen. Das Plastidgenom ist zirkulär und variiert in der Größe zwischen Pflanzenspezies von etwa 120 bis etwa 217 Kilobasenpaaren (kb). Das Genom umfasst typischerweise eine große invertierte Sequenzwiederholung, die bis zu etwa 76 Kilobasenpaare enthalten kann, die aber typischerweise eher im Bereich von etwa 20 bis etwa 30 Kilobasenpaaren liegt. Die invertierte Sequenzwiederholung, die im Plastidgenom von verschiedenen Organismen vorhanden ist, ist beschrieben worden (Palmer, J. D. (1990), Trends Genet. 6: 115–120).

[0003] Ein Vorteil der Transformation von Pflanzenplastiden gegenüber der Zellkerntransformation besteht darin, dass die Plastiden der meisten Pflanzen material vererbt werden, und daher werden heterologe Plastidengene nicht durch Pollen verbreitet. Dieses Merkmal ist besonders attraktiv für transgene Pflanzen mit veränderten agronomischen Eigenschaften, da eine eingeführte Resistenz oder Toleranz gegenüber natürlichen oder chemischen Bedingungen nicht an Wildtypverwandte weitergegeben wird.

[0004] Pflanzenplastiden sind auch wichtige Biosynthesezentren. Außer der Photosynthese in Chloroplasten sind Plastiden auch für die Produktion von wichtigen Verbindungen, wie Aminosäuren, komplexen Kohlenhydraten, Fettsäuren und Pigmenten, verantwortlich.

[0005] Plastiden können auch zwei oder mehr Gene ausgehend von einem einzigen Plastiden-Promotorbereich exprimieren. Eine DNA-Sequenz, die in einem Plastid exprimiert wird, kann also mehrere individuelle Bereiche, die jeweils ein Strukturgen codieren, unter der Kontrolle einer einzigen Gruppe von regulatorischen Komponenten umfassen. Es ist also möglich, mehrere Gene in eine Pflanzenzelle einzuführen und dort zu exprimieren, entweder ausgehend von einer gentechnisch eingeführten synthetischen Sequenz oder ausgehend von einem bereits vorhandenen prokaryontischen Gencluster.

[0006] Ein solches Expressionsverfahren ermöglicht eine kostengünstige Produktion bestimmter Proteine und Feinchemikalien im großen Maßstab, die sich über Standard-Zellkern-Transformationsverfahren nicht praktikabel herstellen lassen. Bei der Zellkernexpression ausgehend von eingeführten Genen muss jede codierende Sequenz durch Gentechnik unter die Kontrolle eines eigenen regulatorischen Bereichs gebracht werden, d.h., es muss sich um ein Monocistron handeln. Folglich variieren die Genexpressionsniveaus stark zwischen den eingeführten Sequenzen, und es müssen mehrere transgene Pflanzenlinien erzeugt werden, wobei Kreuzungen notwendig sind, um alle Cistronen in eine einzige Pflanze einzuführen und eine richtig koordinierte Expression im gewünschten biochemischen Syntheseweg zu erhalten.

[0007] Plastiden können in einer sehr hohen Kopienzahl in einer Pflanzenzelle vorhanden sein, wobei im Falle des Chloroplastengenoms bis zu 50 000 Kopien pro Zelle vorhanden sind (Bendich, A. J. (1987) BioEssays 6: 279–282). Über die Plastidentransformation können Pflanzenzellen also gentechnisch so verändert werden, dass sie ein eingeführtes interessierendes Gen in einer sehr hohen Kopienzahl aufrechterhalten.

[0008] Aus all den obigen Gründen stellen die Plastiden höherer Pflanzen ein attraktives Ziel für die Gentechnik dar. Eine stabile Transformation von Plastiden wurde bei der Grünalge Chlamydomonas (Boynton et al. (1988), Science 240: 1534–1538) und in jüngerer Zeit bei höheren Pflanzen berichtet (Svab et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 8526–8530: Svab und Maliga (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 913–917; Staub, J. M. und Maliga, P. (1993), EMBO J. 12: 601–606). Das für die Plastidentransformation in höheren Pflanzen offenbarte Verfahren beruht auf der Abgabe von DNA, die einen Selektionsmarker enthält, mit einer Teilchenkanone und Zielsteuerung der DNA zum Plastidengenom durch homologe Rekombination.

[0009] Es gibt viele Beispiele, wo höhere Expressionsniveaus wünschenswert wären, als es bei einer Zellkernexpression möglich ist. Ein Beispiel ist in jenen Fällen zu finden, wo man eine neue Substanz in einer reifen Pflanze zur anschließenden Extraktion und Reinigung erzeugen möchte. Weitere Beispiele für Proteine, die vielleicht auf sehr hohem Niveau exprimiert werden müssen, sind solche, die bei der Pflanze Resistenz- oder

Toleranzphänotypen erzeugen. Ein Beispiel für einen solchen Phänotyp ist ein Toxin, das gegen Pflanzenschädlinge wirkt.

[0010] Insbesondere gibt es ein fortwährendes Bedürfnis nach der Einführung von neu entdeckten oder alternativen Bacillus-thuringiensis-Genen in Kulturpflanzen. Cry-Proteine (d-Entotoxine) aus Bacillus thuringiensis haben eine starke insektizide Wirkung gegen mehrere Insekten aus den Ordnungen Lepidoptera, Diptera und Coleoptera. Diese Proteine werden anhand der Aminosäuresequenzhomologie und insektiziden Aktivität als CryI bis CryV klassifiziert. Die meisten CryI-Proteine werden als Protoxine synthetisiert (etwa 130–140 kDa), dann solubilisiert und proteolytisch zu aktiven Toxinfragmenten (etwa 60–70 kDa) prozessiert.

[0011] Die geringe Expression der Protoxin-Gene ausgehend vom Zellkern von Pflanzen erforderte bisher die Verwendung von "Rumpfversionen" dieser Gene. Die Rumpfversionen codieren nur für die aktiven Toxinfragmente. Weitere Versuche, die Expressionseffizienz zu erhöhen, beinhalteten die Neusynthese der Bacillusthuringiensis-Toxin-Gene unter Verwendung von Codons, die von Pflanzen bevorzugt werden. Bei einer solchen ausgedehnten Rekonstruktion dieser großen cry-Gene (ungefähr 3,5 kb) können viele Probleme entstehen, und das Verfahren ist sowohl aufwändig als auch kostspielig.

[0012] Probleme können auch entstehen, wenn neue Insektenschädlinge endemisch werden oder wenn bestehende Populationen eine Resistenz gegen eine bestimmte Konzentration oder Art von Bacillus-thuringiensis-Toxin entwickeln. Es gibt also ein besonderes Bedürfnis nach einer Produktion von höheren und dadurch effektiveren Konzentrationen des Bacillus-thuringiensis-Toxins in Pflanzen, ein Bedürfnis, das mit der Zeit nur noch zunehmen wird.

Kurzbeschreibung der Erfindung

[0013] Durch diese Erfindung werden Plastiden-Expressionskonstrukte bereitgestellt, die für die gentechnische Veränderung von Pflanzenzellen geeignet sind und für eine verstärkte Expression eines Fremdpeptids in Plastiden von Pflanzenzellen sorgen. Das transformierte Plastid ist vorzugsweise ein stoffwechselaktives Plastid, wie die Chloroplasten, die man in Geweben grüner Pflanzen einschließlich Blättern oder Keimblättern findet. Das Plastid ist vorzugsweise eines, das in dem interessierenden Pflanzengewebe in sehr hoher Kopienzahl aufrechterhalten wird.

[0014] Die Plastiden-Expressionskonstrukte zur Verwendung in dieser Erfindung beinhalten einen Plastiden-Promotorbereich und eine interessierende DNA-Sequenz, die in transformierten Plastiden exprimiert werden soll. Die interessierende DNA-Sequenz kann ein einzelner codierender Bereich sein oder mehrere aufeinanderfolgende codierende Bereiche, die als Operon exprimiert werden, enthalten, zum Beispiel wenn man einen fremden biochemischen Syntheseweg in Plastiden einführen möchte.

[0015] Die codierende DNA-Sequenz des Konstrukts codiert dieselbe Aminosäuresequenz wie die native DNA-Sequenz, verwendet aber Codons, die in Bezug auf den Adenin- und Thymingehalt angereichert sind. Als Beispiel kann eine native DNA-Sequenz so resynthetisiert werden, dass sie einen Adenin- und Thymingehalt aufweist, der vom Pflanzenplastid bevorzugt wird. Während der prozentuale Adenin- und Thymingehalt des Zellkerngenoms von Organismus zu Organismus variiert, umfasst der Codongebrauch in Pflanzen im Allgemeinen mehr Guanin/Cytosin- als Adenin/Thymin-Paarungen, und daher gilt der Gehalt als in Bezug auf Guanin plus Cytosin angereichert.

[0016] Die Plastiden-Expressionskonstrukte dieser Erfindung können mit einem Konstrukt verknüpft werden, das eine DNA-Sequenz aufweist, die einen Selektionsmarker codiert, der in einem Pflanzenplastid exprimiert werden kann. Die Expression des Selektionsmarkers ermöglicht die Identifizierung von Pflanzenzellen, die ein Plastid umfassen, das den Marker exprimiert.

[0017] In einer bevorzugten Ausführungsform beinhalten Transformationsvektoren für die Übertragung des Konstrukts in eine Pflanzenzelle Mittel zum Einfügen der Expressions- und Selektionskonstrukte in das Plastidengenom. Dazu gehören vorzugsweise Bereiche, die zum Zielplastidengenom homolog sind und die Konstrukte flankieren.

[0018] Durch diese Erfindung wird außerdem ein Verfahren bereitgestellt, durch das ein Plastidenexpressionskonstrukt verwendet wird, um ein interessierendes Peptid in einer Pflanzenzelle zu erzeugen. Das Peptid wird in einem Plastid der Pflanzenzelle ausgehend von einer DNA-codierenden Sequenz des Peptids exprimiert, die in Bezug auf Adenin und Thymin angereichert ist.

[0019] Durch diese Erfindung wird das insektizide Bacillus-thuringiensis-Toxin in Plastiden einer Pflanzenzelle ausgehend von der nativen codierenden DNA-Sequenz mit verstärkten Expressionsniveaus eines insektenresistenten Phänotyps, gemessen durch Insektenfütterungstests, erzeugt. Bei der nativen codierenden Bacillus-thuringiensis-DNA-Sequenz kann es sich um die Rumpfversion handeln, die für das aktive Fragment spezifisch ist. Diese Erfindung gibt auch die Expression des Bacillus-thuringiensis-Toxins ausgehend von der unverkürzten Sequenz, die das Protoxin codiert, an.

[0020] Nach einem Verfahren der Erfindung erzeugte Pflanzenzellen und Pflanzen, die ein Plastidenexpressionskonstrukt umfassen, sind ebenfalls Gegenstand dieser Erfindung.

Beschreibung der Figuren

[0021] Fig. 1 zeigt die Integration von cry-Genen aus den Vektoren pZS223 und pZS224 in das Wildtyp-Plastidengenom (Nt-ptDNA), was die Transplastome Nt-pZS223-ptDNA bzw. Nt-pZS224-ptDNA ergibt.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0022] Ein Plastidenexpressionskonstrukt dieser Erfindung umfasst einen Promotor, der in einem Pflanzenplastid funktioniert, eine DNA-Sequenz, die ein interessierendes Peptid codiert, und einen Transcriptionsterminationsbereich, der die Transcription in einem Pflanzenplastid beenden kann. Diese Elemente werden als funktionell miteinander verknüpfte Komponenten in der 5'→3'-Transcriptionsrichtung bereitgestellt.

[0023] Jede codierende DNA-Sequenz, die in Bezug auf den Gehalt von Adenin plus Thymin angereichert ist und die in das Plastidengenom einer Pflanzenzelle eingesetzt werden kann, so dass man eine verstärkte Expression eines interessierenden Peptids ausgehend von der codierenden DNA-Sequenz erhält, kann verwendet werden.

[0024] Bei der Entwicklung der Konstrukte können die verschiedenen Fragmente, die die regulatorischen Bereiche und das offene Leseraster umfassen, verschiedenen Verarbeitungsbedingungen, wie Ligierung, Abbau mit Restriktionsenzymen, PCR, in-vitro-Mutagenese oder Zugabe von Linkern und Adaptoren, unterworfen werden. Mit der DNA, die in den regulatorischen Bereichen eingesetzt wird, oder den interessierenden DNA-Sequenzen zur Expression in den Plastiden können also Nucleotidtransitionen, -transversionen, -insertionen oder -deletionen durchgeführt werden. Verfahren zum Abbau mit Restriktionsenzymen, Klenow-Behandlungen für glatte Enden, Ligierungen und dergleichen sind dem Fachmann wohlbekannt und wurden zum Beispiel von Maniatis et al. beschrieben (in Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

[0025] Während der Herstellung der Konstrukte werden die verschiedenen DNA-Fragmente häufig in einem geeigneten Klonierungsvektor kloniert, der die Amplifikation der DNA, Modifikation der DNA oder Manipulation der DNA durch Hinzufügen oder Entfernen von Sequenzen oder Linkern ermöglicht. Vorzugsweise sind die Vektoren zur Replikation bis zu wenigstens einer relativ hohen Kopienzahl in E. coli befähigt. Zum Klonieren sind mehrere Vektoren leicht erhältlich, einschließlich Vektoren wie pBR322, Vektoren der pUC-Reihe, die Vektoren der M13-Reihe und pBluescript-Vektoren (Stratagene; La Jolla, CA).

[0026] Um ein Mittel zum Selektieren der gewünschten Pflanzenzellen bereitzustellen, enthalten Vektoren für die Plastidentransformation typischerweise ein Konstrukt, das für die Expression eines Selektionsmarker-Gens sorgt. Marker-Gene sind pflanzenexprimierbare DNA-Sequenzen, die ein Polypeptid exprimieren, das einer natürlichen Hemmung durch Inhibitoren widersteht oder eine selektive Substanz, d.h. ein Antibiotikum oder Herbizid, dämpft oder inaktiviert.

[0027] Alternativ dazu kann ein Marker-Gen auch für irgendeine andere sichtbare Reaktion sorgen, d.h. ein erkennbares Erscheinungsbild oder Wachstumsmuster, im Vergleich zu Pflanzen oder Pflanzenzellen, die das Selektionsmarker-Gen nicht exprimieren, in Gegenwart einer bestimmten Substanz verursachen, die entweder direkt auf die Pflanze oder die Pflanzenzellen aufgebracht wird oder im Wachstumsmedium der Pflanze oder Pflanzenzelle vorliegt.

[0028] In beiden Fällen haben die Pflanzen oder Pflanzenzellen, die solche Selektionsmarker-Gene enthalten, einen für Identifikationszwecke erkennbaren Phänotyp, d.h. sie sind von nichttransformierten Zellen unterscheidbar. Der charakteristische Phänotyp ermöglicht die Identifizierung von Zellen, Zellgruppen, Geweben, Organen, Pflanzenteilen oder ganzen Pflanzen, die das Konstrukt enthalten.

[0029] Der Nachweis des Markerphänotyps ermöglicht die Auswahl von Zellen, die ein zweites Gen aufweisen, mit dem das Marker-Gen verknüpft wurde. Dieses zweite Gen umfasst typischerweise einen wünschenswerten Phänotyp, der sich in transformierten Zellen nicht leicht identifizieren lässt, der aber vorhanden ist, wenn die Pflanzenzellen oder ihr Abkömmling bis zur Reife wachsen gelassen wird, selbst unter Bedingungen, bei denen der Phänotyp des Selektionsmarkers selbst nicht erkennbar ist.

[0030] Die Verwendung eines solchen Markers zur Identifizierung von Pflanzenzellen, die ein Plastidenkonstrukt enthalten, ist beschrieben worden, Svab et al. (1993, a.a.O.). In den im Folgenden angegebenen Beispielen wird ein bakterielles aadA-Gen als Marker unter der regulatorischen Kontrolle des Chloroplasten-5'-Promotors und von 3'-Transcriptionsterminationsbereichen, insbesondere dem Tabak-16S-rRNA-Promotor-rrn-Bereich und dem rps16-3'-Terminationsbereich, exprimiert. Zahlreiche weiteren Promotorbereiche können ebenfalls verwendet werden, um die Expression des Selektionsmarker-Gens anzutreiben, einschließlich verschiedener Plastidenpromotoren und bakterieller Promotoren, von denen gezeigt wurde, dass sie in Pflanzenplastiden funktionieren.

[0031] Die Expression des aadA-Gens verleiht Resistenz gegen Spectinomycin und Streptomycin und ermöglicht somit die Identifizierung von Pflanzenzellen, die diesen Marker exprimieren. Das aadA-Genprodukt ermöglicht ein fortgesetztes Wachsen und Grünen von Zellen, deren Chloroplasten das Produkt des Selektionsmarker-Gens umfassen. Zellen, die das Produkt des Selektionsmarker-Gens nicht enthalten, werden gebleicht. Die Selektion anhand des aadA-Genmarkers beruht also auf der Identifizierung von Pflanzenzellen, die durch die Anwesenheit von Streptomycin oder besonders bevorzugt Spectinomycin im Pflanzenwachstumsmedium nicht gebleicht werden.

[0032] Mehrere Marker wurden zur Verwendung mit Pflanzenzellen entwickelt, wie Resistenz gegen Chloramphenicol, das Aminoglycosid G418 und Hygromycin. Andere Gene, die ein am Chloroplastenstoffwechsel beteiligtes Produkt codieren, können ebenfalls als Selektionsmarker verwendet werden. Zum Beispiel können Gene, die Resistenz gegen Pflanzenherbizide, wie Glyphosat, Bromoxynil oder Imidazolinon, verleihen, besondere Verwendung finden. Solche Gene wurden beschrieben (Stalker et al., J. Biol. Chem. (1985) 260: 4724–4728 (glyphosatresistentes EPSP); Stalker et al., J. Biol. Chem. (1985) 253: 6310–6314 (bromoxynilresistentes Nitrilase-Gen); und Sathasivan et al., Nucl. Acids Res. (1990) 19: 2188 (AHAS-Imidazolinon-Resistenz-Gen)).

[0033] Die stabile Transformation von Tabakplastidengenomen durch Teilchenbombardierung wurde beschrieben (Svab et al. (1990, a.a.O.) und Svab et al. (1993, a.a.O.)). Die dort beschriebenen Verfahren können eingesetzt werden, um Pflanzen zu erhalten, die homoplasmatisch für Plastidenexpressionskonstrukte sind.

[0034] Im Allgemeinen wird das bombardierte Gewebe ungefähr 2 Tage lang auf einem die Zellteilung fördernden Medium kultiviert, und danach wird das Pflanzengewebe in ein Selektionsmedium übergeführt, das eine inhibitorische Menge des besonderen Selektionsmittels sowie die besonderen Hormone und anderen Substanzen enthält, die notwendig sind, um eine Regeneration dieser besonderen Pflanzenspezies zu erhalten. Dann werden Schösslinge auf demselben Selektionsmedium subkultiviert, um eine Produktion und Selektion von homoplasmatischen Schösslingen zu gewährleisten.

[0035] Die Homoplasmie wird durch Southern-Analyse bestätigt. In den im Folgenden angegebenen Beispielen wird mit BamHI abgebaute gesamtzelluläre DNA mit verschiedenen Sonden getestet, insbesondere einem Teil des Plastidenzielsteuerungsfragments, einem aadA-Fragment, einem 1,8-kb-cry1A-Fragment und einem 3,5-kb-Fragment des cry73-codierenden Bereichs. Eine Southern-Blot-Analyse mit diesen Sonden bestätigt die Integration der chimären cry-Gene in das Tabakplastidengenom unter Bildung von Transplastom-Linien.

[0036] Als Alternative zu einer zweiten Runde der Schösslingsbildung kann man die anfangs ausgewählten Schösslinge auch zu reifen Pflanzen wachsen lassen und sich auf die Segregation verlassen, um transformierte Pflanzen zu erhalten, die homoplasmatisch bezüglich des eingefügten Genkonstrukts sind.

[0037] Wenn Transformations- und Regenerationsverfahren für eine gegebene Pflanzenspezies angepasst wurden, entweder durch Agrobacterium-vermittelte Transformation, Bombardierung oder ein anderes Verfahren, können die etablierten Techniken zur Verwendung in Selektions- und Regenerationsverfahren zur Bildung von plastidtransformierten Pflanzen modifiziert werden. Zum Beispiel lassen sich die hier für Tabak beschriebenen Verfahren leicht an andere Nachtschattengewächse, wie Tomate, Petunie und Kartoffel, anpassen.

[0038] Bei Brassica beinhalten die Anweisungen für die Agrobacterium-vermittelte Transformation und Rege-

neration im Allgemeinen die Verwendung von Hypokotylgewebe, eines nichtgrünen Gewebes, das einen geringen Plastidengehalt aufweisen könnte. Bevorzugte Zielgewebe für Brassica wären also von Mikrosporen abgeleitete Hypokotyl- oder Kotyledonargewebe (die grün sind und daher zahlreiche Plastiden enthalten) oder Blattgewebeexplantate. Während die Regenerationsgeschwindigkeiten von solchen Geweben gering sein können, sind keine positionalen Effekte, wie man sie bei der Agrobacterium-vermittelten Transformation beobachtet, zu erwarten, und daher wäre es nicht notwendig, zahlreiche erfolgreich transformierte Pflanzen zu durchmustern, um einen gewünschten Phänotyp zu erhalten.

[0039] Die Vektoren zur Verwendung in der Plastidentransformation enthalten vorzugsweise Mittel zur Gewährleistung einer stabilen Übertragung des Plastidenexpressionskonstrukts und Selektionsmarker-Konstrukts in das Plastidengenom. Dies wird am zweckmäßigsten durch Bereiche der Homologie mit dem Zielplastidengenom erreicht. Die Homologiebereiche flankieren das zu übertragende Konstrukt und sorgen für eine Übertragung auf das Plastidengenom durch homologe Rekombination über einen doppelten Crossover in das Genom. Die vollständige DNA-Sequenz des Plastidengenoms von Tabak ist beschrieben worden (Shinozaki et al. (1986) EMBO J. 5: 2043–2049). Vollständige DNA-Sequenzen der Plastidengenome von Lebermoos (Ohyama et al. (1986) Nature 322: 572–574) und Reis (Hiratsuka et al. (1989) Mol. Gen. Genet. 217: 185–194) wurden ebenfalls beschrieben.

[0040] Wenn sich die Homologiebereiche in den Bereichen der invertierten Sequenzwiederholungen des Plastidengenoms (als IRA und IRB bekannt) befinden, werden zwei Kopien des Transgens pro transformiertem Plastid erwartet. Die Homologiebereiche innerhalb des Plastidengenoms haben eine Größe von ungefähr 1 kb. Kleinere Homologiebereiche können ebenfalls verwendet werden, und bereits 100 bp können für eine homologe Rekombination in das Plastidengenom sorgen. Die Häufigkeit der Rekombination und somit die Häufigkeit der Gewinnung von Pflanzen mit transformierten Plastiden nimmt jedoch mit sinkender Größe der Homologiebereiche ab.

[0041] Beispiele für Konstrukte mit Homologiebereichen im Plastidengenom werden bei Svab et al. (1990, a.a.O.) und Svab et al. (1993, a.a.O.) beschrieben. Bereiche, die für die Rekombination in Tabak- und Brassica-Plastidengenome geeignet sind, werden ebenfalls in den folgenden Beispielen identifiziert, aber homologe Rekombinations- und Selektionskonstrukte können unter Verwendung von vielen Plastiden-DNA-Sequenzen und für beliebige Zielpflanzenspezies hergestellt werden. In den hier angegebenen Beispielen lenken die flankierenden Tabakplastiden-Homologiebereiche des Plastidenexpressionskonstrukts die Insertion eines Bacillus-thuringiensis-Transgens in das Tabakgenom zwischen das trnV- und das rps12-Operon. Da die Integration in das Plastidengenom durch homologe Rekombination erfolgt und sich die Zielstelle in einem Bereich des Plastidengenoms mit invertierten Sequenzwiederholungen befindet, werden zwei Kopien des Transgens pro Plastidengenom erwartet. Die Selektion erfolgt anhand des Spectinomycin-Resistenz-Marker-Phänotyps, der durch das aadA-Gen exprimiert wird.

[0042] In den Beispielen wird das native cry-Gen, d.h. das cry-Gen mit einem unmodifizierten codierenden Bereich für das Protoxin, für die Expression von Bacillusthuringiensis-Toxin ausgehend von dem Pflanzenplastid in ein Plastidenexpressionskonstrukt eingefügt.

[0043] Ein synthetisches Bacillus-thuringiensis-Gen wird in dasselbe Expressionskonstrukt eingefügt wie das Protoxin-Gen. Das synthetische Gen wird so ausgestaltet, dass es die Codons wie in der kleinen Untereinheit von Tabak-RuBPCO verwendet, mit einer gesamten Erhöhung des Gehalts an Guanin plus Cytosin auf 55% (in Bezug auf den Gehalt des nativen Gens von 39%), und wurde so verkürzt, dass nur diejenigen Sequenzen zurückbleiben, die das aktive Fragment des Toxins codieren. Es ist bekannt, dass ein solches Gen für eine optimale Expression ausgehend von dem Pflanzen-Zellkerngenom sorgt. Sowohl das bakterielle Gen, das für die erhöhte Expression ausgehend von einer Transformation in den Pflanzenzellkern resynthetisiert wurde, als auch das nicht resynthetisierte, nicht verkürzte Wildtyp-Gen, das zum Protoxin führt, werden über einen Chloroplastentransformationsvektor eingeführt (**Fig. 1**).

[0044] Unerwarteterweise zeigt sich, dass die Expression des Toxins ausgehend von der nativen codierenden Sequenz für das Gen stark verstärkt wird, im Gegensatz zu einer Version des Gens, die so resynthetisiert wurde, dass sich den bevorzugten Codons des Pflanzengenoms angenähert wurde. Tabaklinien, die die native codierende Sequenz enthalten, zeigen eine starke insektizide Bioaktivität, die durch Insektenfütterungstests gemessen wird. Tabaklinien mit einem synthetischen crylA(c)-Gen zeigen keine beobachtbare Bioaktivität. Da in beiden Fällen die Konstrukte in kontrollierter Weise durch homologe Rekombination ausgehend von demselben Plastidenvektor eingeführt werden, können die Unterschiede nicht durch positionale Effekte erklärt werden.

[0045] In transformierten Pflanzen, die die native codierende Sequenz enthalten, befindet sich das Bacillus-thuringiensis-Toxin als Komponente, die bis zu etwa 5% oder mehr des Gesamtblattproteins ausmacht, ein Niveau, das viel höher ist als im Blatt von Pflanzen, die aus einer Zellkerntransformation resultieren. In Pflanzen, die das Gen enthalten, das so resynthetisiert wurde, dass sich den bevorzugten Codons des Pflanzengenoms angenähert wird, erscheint die mRNA, die zum Toxin führt, reduziert, und im Blatt scheint nur wenig oder gar kein Toxinprotein vorhanden zu sein.

[0046] Dass ein natives Bacillus-thuringiensis-Toxin-Gen im Plastid auf einem so hohen Niveau exprimiert wird, während ein ansonsten identisches Konstrukt, das ein Bacillus-thuringiensis-Gen enthält, das für eine effiziente Zellkernexpression resynthetisiert wurde, im Plastid nur sehr schlecht exprimiert wird, obwohl es im Plastid dieselbe Kopienzahl aufweist, lässt vermuten, dass der Gehalt des Plastiden-Transgens an Adenin plus Thymin die Expression stark beeinflusst. Wie bereits angemerkt, wurde der Gehalt des synthetischen Gens an Guanin plus Cytosin auf 55% erhöht, was relativ zum Gehalt des Plastidengenoms von weniger als 40% Guanin plus Cytosin hoch ist. Dieser Unterschied kann eine ineffiziente Prozessierung der mRNA verursachen oder zu einer Erhöhung ihrer Abbaugeschwindigkeit führen. Das native Bacillus-thuringiensis-Gen hat einen prozentualen Gehalt an Guanin plus Cytosin, der besser mit dem des Plastidengenoms übereinstimmt und somit die Codonverwendung eines Plastidengens stärker begünstigt.

[0047] Der Gehalt der jeweiligen Gene an Adenin plus Thymin erklärt vielleicht nicht ganz die dramatischen Unterschiede in der Expression der nativen und synthetischen Bacillus-thuringiensis-Toxin-Proteine. Ein zusätzlicher Faktor, der postuliert werden könnte, besteht darin, dass unerwünschte oder hochgradig ineffiziente Plastiden-RNA-Prozessierungssignale in das synthetische cryIA(c)-Gen eingeführt werden. Wenn solche Signale vorhanden wären, könnten sie die Expression des Toxins stark reduzieren oder sogar beseitigen.

[0048] Auf jeden Fall wird jetzt gezeigt, dass die Codonverwendung des nativen Bacillus-thuringiensis-Gens in der Plastidenexpression ein Expressionsniveau erreicht, das viel höher ist, als es mit der resynthetisierten Sequenz desselben Gens möglich ist, was beweist, dass ein Gen mit einer bakteriellen Codonverwendung in einem Pflanzenplastid hohe Expressionsniveaus erreichen kann. Aufgrund der obigen Ergebnisse entfällt die Notwendigkeit, eine bestimmte Klasse von Genen für die auf hohem Niveau erfolgende Expression in Pflanzen zu resynthetisieren.

[0049] Die interessierende DNA-Sequenz kann eine natürliche Codonverwendung mit hohem Adenin- und Thymingehalt haben, wie es bei dem Bacillus-thuringiensis-Gen der Fall ist, oder alternativ dazu kann sie so resynthetisiert werden, dass der Gehalt an Adenin plus Thymin angereichert wird. Tatsächlich können die hier beschriebenen Konstrukte und Verfahren zwar mit einer Vielzahl von nativen bakteriellen codierenden DNA-Sequenzen eingesetzt werden, doch kann ein breiteres Spektrum von potentiellen Genzielen für die auf hohem Niveau erfolgende Plastidenexpression erhalten werden, indem man Gene, zum Beispiel Pflanzenzellkern-Gene, so resynthetisiert, dass der Adenin- und Thymingehalt der codierenden Sequenz erhöht wird.

[0050] Nachdem die Erfindung nun allgemein beschrieben wurde, wird sie anhand der folgenden Beispiele besser verständlich sein.

Beispiele

[0051] In der folgenden experimentellen Offenbarung sind alle Temperaturen in Grad Celsius (°C) angegeben, Gewichte sind in Gramm (g), Milligramm (mg) oder Mikrogramm (µg) angegeben, die Konzentrationen sind als molar (M), millimolar (mM) oder mikromolar (µM) angegeben, und alle Volumina sind in Liter (l), Milliliter (ml) oder Mikroliter (µl) angegeben, wenn nichts anderes angegeben ist.

Beispiel 1. Plastidentransformationsvektoren

[0052] Konstrukte und Verfahren zur Verwendung beim Transformieren der Plastiden von höheren Pflanzen sind bei Svab et al. (1990, a.a.O.), Svab et al. (1993, a.a.O.) und Staub et al. (1993, a.a.O.) beschrieben. Die vollständigen DNA-Sequenzen des Plastidengenoms von Tabak werden von Shinozaki et al. (1986, a.a.O.) angegeben. Alle Plastiden-DNA-Referenzen in der folgenden Beschreibung beziehen sich auf die Nucleotidenzahl aus Tabak.

[0053] Das cryIA(c)-Gen wird aus dem Plasmid pBtkHD73 (Toagosei Chemical Co., Japan) erhalten. Dieses Gen wird durch Abbau mit SmaI/NsiI weiterverarbeitet, und ein synthetischer Adaptor wird eingefügt (oberer Strang: 5'-CCCGGATCCATGGATAACAATCCGAACATCAATGAATGCA-3'; unterer Strang: 5'-TTCATT-

GATGTTCGGATTGTTATCCATGGATCCGGG-3'). Dann wird der gesamte 5'-untranslatierte Bereich aus dem cryIA(c)-Gen entfernt, und am natürlichen Startcodon (Position 163 der Nucleotidsequenz (Adang et al. (1985), Gene 36, 289–300)) wird eine NcoI-Stelle eingeführt. Unmittelbar stromaufwärts der NcoI-Stelle wird eine BamHI-Stelle eingeführt. Eine Oligonucleotid-Mutagenese wird so durchgeführt, dass direkt neben dem Stopcodon des cryIA(c)-Gens BglII- und SalI-Stellen eingeführt werden, um die Entfernung von unerwünschter DNA 3' des codierenden Bereichs zu erleichtern. Die übrige Sequenz beinhaltet den gesamten codierenden Bereich, der zum Protoxin führt.

[0054] Ein synthetisches cryIA(c)-Gen, das das aktive Toxinfragment codiert, wird aufgebaut, indem man Oligonucleotide mit 70 bzw. 90 Basen assoziiert und ligiert, in einem Verfahren, wie es bei Wosnick et al. (1987), Gene 60, 115–127, beschrieben ist. Das synthetische Gen wird so ausgestaltet, dass es die Codons wie in der kleinen Untereinheit von Tabak-Rubisco verwendet, einschließlich eines Guanin- und Cytosingehalts von 55%, mit einer NcoI-Stelle am Startcodon und einer SalI-Stelle am Stopcodon, während es immer noch die Aminosäuresequenz des Toxins codiert. Dieses synthetische Gen ist jedoch auch so verkürzt, dass der codierende Bereich nur die Aminosäuresequenz des aktiven Fragments des Protoxins ergibt.

[0055] Ein Plastidentransformationsvektor wird verwendet, der ein Passenger-Gen in einer Prrn(L)rbcL(S)/Trps16-Expressionscassette mit Polylinker-Restriktionsstellen trägt. Die Prrn(L)rbcL(S)-Fragmente sind in Svab et al. (1993, a.a.O.) beschrieben. Um die Stabilität der mRNAs weiter zu sichern, wird das Trps16-Fragment stromabwärts des codierenden Bereichs des Passenger-Gens kloniert. Das Trps16-Fragment umfasst den 3'-regulatorischen Bereich des rps16-Gens von Nucleotid 5087 bis 4939 in der Tabakplasmid-DNA.

[0056] Chimäre Gene werden vorzugsweise so in den Vektor eingesetzt, dass ihre Transcription zum rrn-Operon hin gelenkt wird. Im Plastidengenom werden chimäre Gene ausgehend vom 5'-regulatorischen Bereich von Prrn(L)rbcL(S)transcribiert, der das lange rrn-Operon-Promotorfragment von den Nucleotiden 102 561 bis 102 677 des Tabakplastidengenoms umfasst, das mit einer synthetischen Leitsequenz fusioniert ist, die gemäß der Leitsequenz des rbcL-Gens zwischen den Nucleotiden 57 569 und 57 584 in der Plastiden-DNA gestaltet ist.

[0057] Der Plastidentransformationsvektor trägt auch ein selektierbares Spectinomycin-Resistenz-Gen(aadA) unter der Kontrolle von psbA-Genexpressionssignalen. Die regulatorischen und codierenden Sequenzen werden auch von Plastiden-DNA-Homologiebereichen flankiert, deren Grenzen bp 138 447 (EcoRI) bis 140 219 (HincII) und 140 219 (HincII) bis 141 382 (BglII) des Tabakplastidengenoms sind (Shinozaki et al. (1986, a.a.O.)). Dadurch wird die Insertion von fremden Genen, die sich zwischen den flankierenden Bereichen befinden, in das Plastid zwischen dem trnV-Gen und dem rp12/7-Operon gelenkt.

[0058] Dieser Plastidentransformationsvektor wird mit den Restriktionsendonucleasen NcoI/SalI abgebaut, so dass der codierende Bereich des Passenger-Gens entfernt wird, der dann durch ein NcoI/SalI-Fragment ersetzt wird, das den synthetischen cryIA(c)-codierenden Bereich enthält, was einen Vektor ergibt, der als pZS223 bezeichnet wird (**Fig. 1**). Das Wildtyp-cryIA(c)-Protoxin-Gen wird in ähnlicher Weise als NcoI/SalI-Fragment kloniert, was ein Plasmid ergibt, das als pZS224 bezeichnet wird. Durch diesen Ansatz wird die Bacillus-thuringiensis-DNA 3' des proteincodierenden Bereichs bei beiden Plasmiden, pZS223 und pZS224, weggelassen.

[0059] Die Insertion der jeweiligen cry-Gene ausgehend von den Vektoren pZS223 und pZS224 in das Wildtyp-Plastidgenom (Nt-ptDNA) unter Bildung der Transplastome Nt-pZS223 bzw. Nt-pZS224 ist in **Fig. 1** gezeigt. Die in **Fig. 1** verwendeten Abkürzungen sind wie folgt: 16S = 16S-rRNA-Gen; trnV = trnV-Gen; aadA = Spectinomycin-Resistenz-Gen; cry1A und cry73 sind ein synthetisches bzw. ein natives Bacillus-thuringiensis-d-Endotoxin-Gen. Die Restriktionsendonuclease-Spaltstellen werden wie folgt bezeichnet: B = BamHI; Bg = BglII; H = HindIII; N = NcoI; RI = EcoRI; RV = EcoRV; 5 = SalI.

Beispiel 2. Pflanzenplastidentransformation

[0060] Die stabile Transformation von Tabakplastidengenomen durch Teilchenbombardierung wird in Svab et al. (1990, a.a.O.) und Svab et al. (1993, a.a.O.) beschrieben. Die dort beschriebenen Verfahren können eingesetzt werden, um Pflanzen zu erhalten, die mit den hier beschriebenen Plastidenexpressionskonstrukten transformiert sind. Solche Verfahren beinhalten im Allgemeinen die DNA-Bombardierung eines Zielwirtsexplantats, vorzugsweise eines Explantats, das aus einem Gewebe hergestellt ist, das reich an stoffwechselaktiven Plastiden ist, wie grünen Pflanzengeweben einschließlich Blättern oder Keimblättern.

[0061] Tabaksamen (N. tabacum v. Xanthi N/C) werden 20 Minuten lang in einer 50%igen Chlorox-Lösung (2,5% Natriumhypochlorit) oberflächensterilisiert und 4mal in sterilem H_2O abgespült. Sie werden aseptisch auf einem Medium mit 0,2 × MS-Salzen ausgebreitet und keimen gelassen. Die Sämlinge werden auf agarverfestigtem MS-Medium mit 30 g/l Saccharose (Murashige et al. (1962) Physiol. Plant 15: 493–497) wachsen gelassen.

[0062] Wolfram-Mikroprojektile (1,0 µM) werden nach Maliga (Maliga, P. (1993), Methods in Plant Molecular Biology – A Laboratory Manual, Hrsg. Pal Maliga, Daniel Klessig, Anthony Cashmore, Wilhelm Gruissem und Joseph Varner; Cold Spring Harbor Press) mit Plasmid-DNA beschichtet und verwendet, um reife Blätter zu bombardieren, die mit der Unterseite nach oben auf RMOP-Medium gelegt wurden; MS-Salze, 1 mg/l BAP, 0,1 mg/l NAA, 30 g/l Saccharose und 0,7% Phytagar, Svab et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 8526–8530 (unter Verwendung des PDS-1000-He-Systems von BioRad (Sanford et al., An Improved, helium-driven Biolistic device, Technique 3: 3–16)). Die Plasmide pZS223 und pZS224 werden als Plasmid-DNA für die Beschichtung verwendet.

[0063] Dann wird das bombardierte Gewebe ungefähr 2 Tage lang auf einem die Zellteilung fördernden Medium kultiviert, und danach wird das Pflanzengewebe auf ein Selektionsmedium übergeführt, das eine inhibitorische Menge des besonderen Selektionsmittels enthält. Transformierte Explantate bilden in ungefähr 3–8 Wochen grüne Schösslinge. Blätter von diesen Schösslingen werden dann auf demselben Selektionsmedium subkultiviert, um die Produktion und Selektion von homoplasmatischen Schösslingen zu gewährleisten.

Beispiel 3. DNA-Gel-Blot-Analyse von transplastomischen Linien

[0064] Transformierte Pflanzen, die anhand der Expression des aadA-Marker-Gens selektiert wurden, werden analysiert, um zu bestimmen, ob der gesamte Plastidgehalt der Pflanze transformiert wurde (homoplasmatische Transformanten). Typischerweise sind nach zwei Runden der Bildung von Schösslingen und der Spectinomycin-Selektion ungefähr 50% der transgenen Pflänzchen, die analysiert werden, homoplasmatisch gemäß der Bestimmung durch Southern-Blot-Analyse der Plastiden-DNA. Homoplasmatische Pflänzchen werden für die weitere Kultivierung selektiert.

[0065] Nach einer zweiten Runde der Bildung von Schösslingen und der Spectinomycin-Selektion werden für jedes Konstrukt zwei transplastomische Linien erhalten, Nt-pZS223 und Nt-pZS224. Diese Linien werden auf Homoplasmie getestet. Southern-Blot-Analyse wird verwendet, um die Integration der chimären cry-Gene in das Tabakplastidengenom zu bestätigen. Die Herstellung, Elektrophorese und Übertragung von DNA auf Filter erfolgen gemäß der Beschreibung (Svab et al. (1993, a.a.O.)).

[0066] Das vollständige Verschwinden des nativen 3,3-kb-Tabak-BamHI-Fragments in den Transformanten Nt-pZS223 und Nt-pZS224, wobei eine Sonde den Integrationsbereich abdeckt, und das Auftreten von Banden mit der erwarteten Größe für die eingesetzten DNA-Fragmente in diesen Transformanten, 5,5 kb bzw. 7,3 kb (siehe **Fig. 1**), bestätigt, dass die transformierten Pflanzen homoplasmatisch in Bezug auf die gewünschten Konstrukte sind. Beim Sondieren identischer Filter mit den Genen aadA, cryIA(c)-Protoxin-Gen und synthetischen cryIA(c)-Genen wurde eine Verknüpfung der Gene aadA und cryIA(c) mit den erwarteten 5,5- und 7,3-kb-BamHI-Fragmenten sowie das Fehlen dieser Gene in der negativen Kontrolle nachgewiesen.

Beispiel 4. Insektenbioassays

[0067] Wie beschrieben, wird die Entwicklung der transformierten Pflanzenlinien Nt-pZS223 und Nt-pZS224 auf RMOP-Medium erreicht, das mit 500 mg/l Spectinomycin-Dihydrochlorid ergänzt ist. Pflanzen werden auf demselben Selektionsmedium nach dem Verfahren gemäß Svab et al. (1990, a.a.O.) subkloniert. Dann werden ausgewählte Pflanzen in MS-Medium gepflanzt, das 1 mg/l IBA, 500 mg/l Spectinomycin-Dihydrochlorid und 0,6% Phytagar enthält.

[0068] Eier von Helicoverpa zea und Heliothis virescens werden vom USDA-ARS in Stoneville, MS, erhalten und schlüpfen gelassen. Neugeborene Larven werden auf Tobacco Budworm Diet von Bioserve (Frenchtown, NJ) gesetzt und 5 Tage lang bei 28°C in einem 16:8-Tag-Nacht-Rhythmus inkubiert. Die Larven entwickeln sich in dieser Zeit bis zum späten zweiten oder frühen dritten Häutungsstadium.

[0069] Nach 5 Tagen werden vollständig ausgebreitete Blätter von den Tabakpflanzen abgeschnitten und auf 3 ml 2%igen Agar in einer 32-Napf-Aufzuchtschale von CD International (Pitman, NJ) gelegt. Es wird eine Larve pro Napf hineingesetzt, verschlossen und 5 Tage lang unter denselben Bedingungen inkubiert. Am 10. Tag

wird das von dem Insekt verbrauchte Blattmaterial geschätzt, und die Insekten werden auf Mortalität überprüft. Die Larven gelten als tot, wenn sie beim Anstoßen mit einer Zange keine Bewegung zeigten.

Beispiel 5. Insektizide Fütterungsaktivität

[0070] Um die Anwesenheit und relative Menge von aktivem Bacillus-thuringiensis-d-Toxin in den Tabaklinien zu bestimmen, die homoplasmatisch in Bezug auf natives Protoxin und synthetische "verkürzte" cryIA(c)-Gen-Expressionskonstrukte sind, wird die Wirksamkeit dieser Pflanzen auf Larven von Heliothis virescens (Amerikanische Tabakeule bzw. Baumwolleule) und Helicoverpa zea (Baumwollkapselwurm) im dritten Häutungsstadium getestet (siehe Tabelle). Beide Testinsekten sind gegenüber dem cryIA(c)-Toxin empfindlich, wobei H. zea zehnfach resistenter ist als H. virescens (MacIntosh et al. (1990), J. Invertebr. Pathol. 56: 258–266).

[0071] Larven des dritten Häutungsstadiums werden für den Bioassay gewählt, weil die Insekten in diesem Stadium resistenter gegen das Toxin sind als Larven des ersten Häutungsstadiums, was einen stringenteren Vergleich zwischen den Kontroll- und Testpflanzen ermöglicht. Tabaklinien, die als 4083 und 4084 bezeichnet werden und durch Zellkerntransformation mit demselben synthetischen cryIA(c)-Gen erhalten wurden, das auch in pZS223 verwendet wurde und sich als hochgradig toxisch gegenüber H.-virescens-Larven des dritten Häutungsstadiums erwiesen hatte, werden in dem Bioassay als positive Kontrollen verwendet. Nicotiana tabacum var. "Petite Havana" dient als negative Kontrolle, da dies der genetische Hintergrund ist, der zur Erzeugung der transplastomischen Linien verwendet wird.

[0072] Tabelle 1 ist eine Zusammenfassung von Bacillus-thuringiensis-Tabak-Insektenfütterungsassays. Die Daten zeigen, dass die transplastomische Linie Nt-pZS224 sehr toxisch sowohl gegenüber H. virescens als auch gegenüber H. zea ist, da sie bei diesen Insekten 100% Mortalität verursacht, während weniger als 2% Gesamtblattschäden entstehen. Dieses Ergebnis ist günstig im Vergleich mit den Ergebnissen für die Tabakpflanzen der positiven Kontrolle 4083 und 4084. Die 4083-2-4-Pflanze verursacht beim Assay mit H. zea 100% Mortalität, lässt jedoch ein viel größeres Ausmaß an Blattfraßschäden zu als die Nt-pZS224-Tabaklinie, was auf eine geringere Toxinproduktion hinweist. Die Tabaklinie 4084-4-1 zeigte bei der Fütterung eine mit Nt-pZS224 vergleichbare Leistung, obwohl sie sich nicht mit den Toxinkonzentrationen vergleichen lässt, die in Nt-pZS224 erzeugt wurden, wenn dieses als Komponente des Gesamtblattproteins gemessen wurde.

[0073] Die Tabaklinie Nt-pZS223 zeigt keine nachweisbare Bioaktivität.

Tabelle 1

Zusammenfassung von Bacillus-thuringiensis-Tabak-Insektenfütterungsassays

Chloroplast	Vektor	getestete Pflanzen	*Heliothis virescens***	% Blattfraß	*Helicoverpa zea***	% Blattfraß
synthetisches Toxin-Gen	pZS223	223-3	keine Mortalität	100%	keine Mortalität	100%
		223-5	keine Mortalität	75%	keine Mortalität	100%
		223-12	NT*		keine Mortalität	100%
		223-13	keine Mortalität	75%	NT*	
Wildtyp-Protoxin-Gen	pZS224	224-5	100% Mortalität	2%	100% Mortalität	2%
		224-9	100% Mortalität	2%	100% Mortalität	2%
Zellkern-Kontrollen						
synthetisches Toxin-Gen	pCGN4083	4083-1-2	100% Mortalität	2%	NT*	
		4083-2-4	NT*		100% Mortalität	40%
	pCGN4084	4084-8-5	100% Mortalität	2%	NT*	
		4084-1-1	NT*		100% Mortalität	2%
untransformierte Kontrollen						
		Kontrolle 1	25% Mortalität	75%	keine Mortalität	100%
		Kontrolle 2	keine Mortalität	100%	NT*	
		Kontrolle 3	50% Mortalität	75%	NT*	

** 10 Larven im dritten Häutungsstadium wurden individuell pro Pflanze getestet

*NT: Pflanze nicht getestet

Patentansprüche

1. Konstrukt, das die folgenden Komponenten umfasst, die in der 5'→3'-Transcriptionsrichtung funktionell miteinander verknüpft sind:
(a) einen Promotor, der in einem Pflanzenplastid funktioniert;
(b) eine DNA-Sequenz, die ein interessierendes Peptid codiert; und
(c) einen Transcriptionsterminationsbereich, der die Transcription in einem Pflanzenplastid beenden kann;
wobei eine native DNA-Sequenz, die das interessierende Peptid codiert, einen gegebenen Adenin- und Thymingehalt hat und wobei die codierende DNA-Sequenz in (b) dieselbe Aminosäuresequenz codiert wie die native DNA-Sequenz und im Vergleich zur nativen DNA-Sequenz einen angereicherten Adenin- und Thymingehalt hat.

2. Konstrukt gemäß Anspruch 1, wobei das Konstrukt weiterhin Folgendes umfasst: (d) ein Gen, das einen Marker für die Selektion von Pflanzenzellen codiert, die ein Plastid umfassen, das den Marker exprimiert, und (e) DNA-Bereiche mit Homologie zum Genom des Plastids;
wobei die Bereiche mit Homologie in (e) die Komponenten (a), (b), (c) und (d) des Konstrukts flankieren.

3. Konstrukt gemäß Anspruch 1, wobei das Pflanzenplastid ein Chloroplast ist.

4. Konstrukt gemäß Anspruch 1, wobei die codierende DNA-Sequenz einen Adenin- und Thymingehalt von mehr als 50% umfasst.

5. Konstrukt gemäß Anspruch 1, wobei die codierende DNA-Sequenz zwei oder mehr interessierende Peptide codiert.

6. Pflanzenzelle oder davon abgeleitete Nachkommenpflanzenzelle, Pflanzengewebe oder davon abgelei-

tete Pflanze, die bzw. das das Konstrukt gemäß Anspruch 1 enthält.

7. Verfahren zur Herstellung eines interessierenden Peptids in einer Pflanzenzelle, wobei das Verfahren das Exprimieren des Peptids in Plastiden der Pflanzenzelle aus einem Konstrukt gemäß Anspruch 1 umfasst.

8. Verfahren gemäß Anspruch 7, wobei das Konstrukt weiterhin (d) ein Gen, das einen Marker für die Selektion von Pflanzenzellen codiert, die ein Plastid umfassen, das den Marker exprimiert, und (e) DNA-Bereiche mit Homologie zum Genom des Plastids umfasst;
wobei die Bereiche mit Homologie in (e) die Komponenten (a), (b), (c) und (d) des Konstrukts flankieren.

9. Verfahren gemäß Anspruch 7, wobei die Pflanzenplastiden Chloroplasten sind.

10. Verfahren gemäß Anspruch 7, wobei die codierende DNA-Sequenz einen Adenin- und Thymingehalt von mehr als 50% umfasst.

11. Verfahren gemäß Anspruch 8, wobei die codierende DNA-Sequenz zwei oder mehr interessierende Peptide codiert.

12. Verfahren gemäß Anspruch 8, wobei das Peptid als Komponente mit einem Anteil von etwa 5% oder mehr des Gewichts des Gesamtproteins der Pflanzenzelle oder der davon abgeleiteten Nachkommenpflanzenzelle, des Pflanzengewebes oder der davon abgeleiteten Pflanze exprimiert wird.

13. Pflanzenzelle oder davon abgeleitete Nachkommenpflanzenzelle, Pflanzengewebe oder davon abgeleitete Pflanze gemäß Anspruch 6, die bzw. das das interessierende Peptid in ihren bzw. seinen Plastiden aus dem Konstrukt gemäß Anspruch 1 exprimiert.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

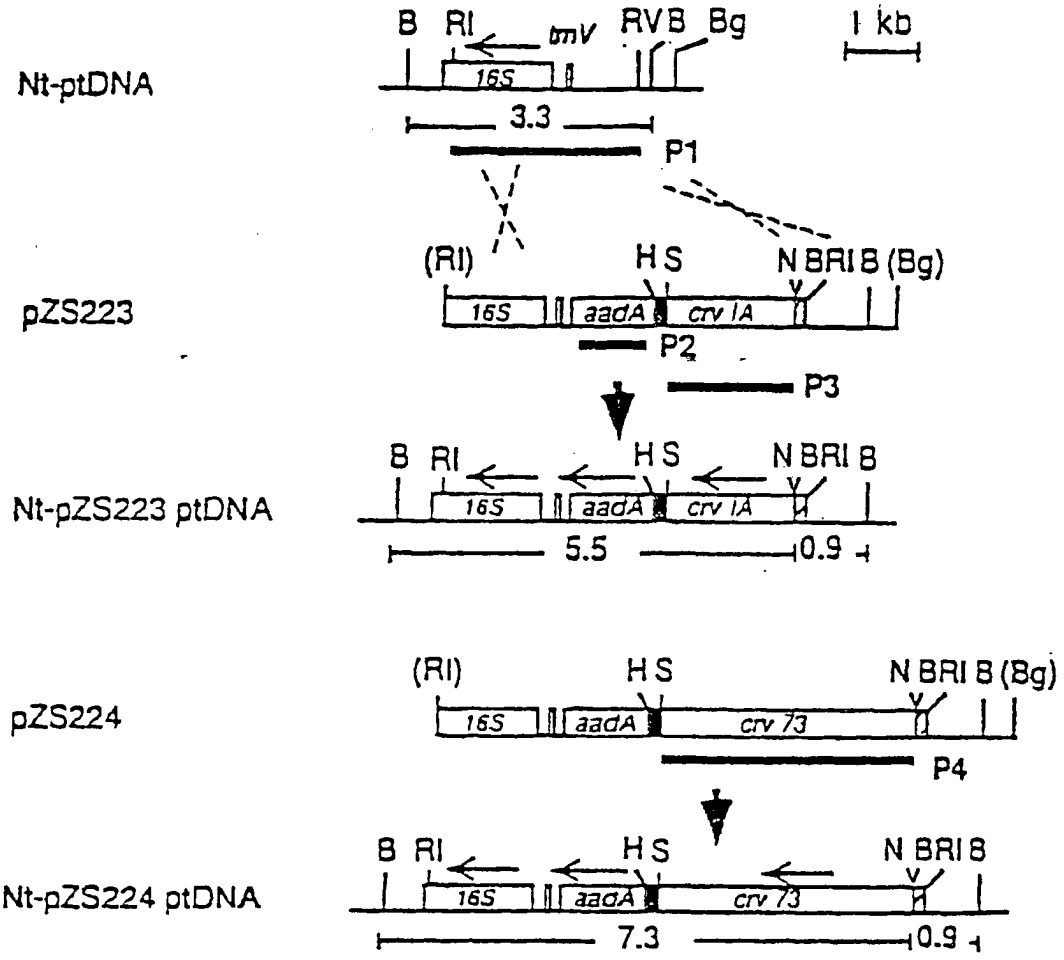


FIG. 1