



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 36 136 T2** 2007.03.15

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 988 387 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 36 136.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/FI98/00445**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 922 831.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/055636**

(86) PCT-Anmeldetag: **28.05.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **10.12.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **29.03.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **11.10.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **15.03.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/67** (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/83 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

972325 02.06.1997 FI

(73) Patentinhaber:

**Atabekov, Joseph, Moskau/Moskva, RU;
Dorokhov, Yuri, Moskau/Moskva, RU; Morozov,
Sergey, Moskau/Moskva, RU; Korpela, Timo,
Turku, FI**

(74) Vertreter:

Wächtershäuser und Kollegen, 80333 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:

**Atabekov, Joseph, Moscow 117311, RU; Korpela,
Timo, 20500 Turku, FI; Dorokhov, Yuri, Moscow
117321, RU; Morozov, Sergey, Moscow, 153458,
RU**

(54) Bezeichnung: **REKOMBINANTES KONSTRUKT FÜR EINE ERHÖHTE EXPRESSION VON GENEN IN PFLANZEN.**

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

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

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft die Gentechnik von Pflanzen durch rekombinante DNA-Technologie unter Verwendung der Molekularbiologie und Biotechnologie. Die Erfindung beschreibt ein DNA-Konstrukt auf der Basis viraler Sequenzen, die dazu fähig sind, die Expression eines Gens in rekombinante DNA-enthaltendem Gewebe zu aktivieren oder zu erhöhen. Die Erfindung ist brauchbar zur Erhöhung der Expression eines Gens, abgeleitet von heterologen Pflanzenspezies oder von nicht-pflanzlichem Ursprung. Die Erfindung erleichtert gentechnologische Verfahren zur Expression von interessierenden Proteinen oder zur Expression von neuen Pflanzen-Phenotypen von ökonomischer Bedeutung oder von Bedeutung für die Forschung. Spezifisch betrifft die Erfindung eine Methode zur Expression einer Gensequenz in Pflanzenzellen oder in einer Pflanze. Die Erfindung betrifft auch ein rekombinantes DNA-Molekül für diese Methode und auch eine mit dem DNA-Molekül transformierte eukaryotische Zelle.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Strukturell polycistronische RNAs vieler Pflanzen- und Tierviren, die zur sogenannten Sindbis-ähnlichen Supergruppe gehören, sind funktionell monocistron: nur das 5'-proximale Gen kann durch eukaryotische Ribosomen translatiert werden. Alle internen translation stillen Gene (silent genes) werden exprimiert aus subgenomischen RNAs (sgRNA), produziert durch Transkription der Minus-Kopie von genomischer RNA voller Länge aus internen Positionen – subgenomische Promotoren (sgPr). Alle RNA-Viren produzieren während ihres replikativen Zyklus die Virus-spezifische RNA-abhängige RNA-Polymerase (Replikase), die für die Synthese verschiedener Spezies von viraler RNA wesentlich ist. Das Replikase-Gen ist 5'-proximal innerhalb der Monopartit-Genome (monopartite genomes) der Glieder von Sindbisähnlichen Viren lokalisiert (z.B. Tabakmosaikvirus, TMB, Kartoffelvirus X, PVX, Brommosaikvirus, BMV), d.h., repräsentiert das einzige translatierbare Gen des polycistronischen Genoms (für eine Übersicht siehe Bruening et al. (1979) in "Molecular Biology of Plants", Academic Press, New York-London, S. 241-272). Spezifische cis-wirkende Sequenzen innerhalb der Minus-Kopie der genomischen RNA sind zur Synthese von sgRNAs erforderlich. Die multifunktionelle Natur der Replikase ermöglicht es, diese internen Sequenzen (sgPrs) zu erkennen, um sgRNAs durch partielle Transkription der negativsträngigen RNA zu synthetisieren. Dieser Mechanismus wurde für einige Pflanzenviren in vitro (Miller et al. (1985), Nature 313, 68-70) und in vivo (Gargouri et al. (1989), Virology 171, 386-393) klar bewiesen.

[0003] Es wurde gezeigt, dass die chimären TMV-

(Donson et al. (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 7204-7208) und PVX- (Chapman et al. (1992), Plant J. 2, 549-557; Hammond-Kosack et al. (1995), Mol. Plant-Microbe Int. 8, 181-185) Vektoren durch Insertion von Fremd-Genen stromabwärts eines sgPr, der die Expression eingeführter Gene aus geeigneter sgRNA ermöglicht, konstruiert werden können. Das bedeutet, dass virale Replikase sgPr an verschiedenen Positionen innerhalb des rekombinanten Minus-Strangs erkennen kann. Darüber hinaus kann aus den intergrierten cDNAs exprimierte virale Replikase in transgenen Pflanzen virale RNAs replizieren und subgenomische RNAs produzieren (Leiser et al. (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 9136-9140). Es kann deshalb angenommen werden, dass die Replikase dazu fähig ist, in trans zu wirken, um in vivo den spezifischen sgPr nicht nur in einem viralen Genom voller Länge, sondern auch in den kurzen chimären Minus-Sense-RNA-Transkripten, die ein Fremd-Gen (in Antisense-Orientierung) tragen, zu erkennen. Das könnte zur Produktion der entsprechenden sgRNA durch den für die virale sgRNA-Synthese angepassten Mechanismus führen.

[0004] Im Gegensatz zur Mehrzahl eukaryotischer mRNAs werden mehrere virale und zelluläre mRNAs durch einen alternativ-internen Ribosomen-Eingangsmechanismus, der die normale Cap-Erkennungsstufe und 5'-nicht-translatiertes Sequenz-Scanning umgeht, translatiert. Insbesondere enthält das Genom von Crucifer-Tobamoviren (crTMV) (Dorokhov et al. (1994), FEBS Letters 350, 5-8) zwei cis-wirkende Sequenzen, die einen internen Ribosomen-Eingang und Translation der 3'-proximalen Gene aus crTMV-RNA vermitteln. Diese Elemente können verwendet werden bei der Konstruktion funktioneller dicistronischer oder polycistronischer eukaryotischer mRNAs. Die Erfinder haben in dieser Erfindung gefunden, dass diese Elemente bei bestimmten Bedingungen zur Expression bei translationalem Niveau von mehr als einem Reporter-Gen innerhalb einer polycistronischen mRNA in eukaryotischen Zellen verwendet werden können.

[0005] Die vollständige Nucleotid-Sequenz des PVX-Genoms wurde für russische (Skryabin et al. (1988a), Nucleic Acid Res. 16, 10929-10930) und mehrere andere Stämme (siehe z.B. Querci et al. (1993), J. Gen. Virol. 74, 2251-2255) berichtet. Das PVX-Genom enthält fünf ORFs, die für die 165 kDa-Replikase, drei Movement-Proteine (MPs) (25 kDa, 12 kDa und 8 kDa) und Hüll-Protein (CP) kodieren ([Fig. 1](#)). Das Replikase-Protein wird direkt aus der genomischen RNA translatiert, und seine Expression wird durch die 5'-untranslatierte genomische Leader-Sequenz ($\alpha\beta$ -Sequenz) gesteuert. Es wurde gezeigt, dass die $\alpha\beta$ -Leader-Sequenz die Translation von Fremd-Genen in vitro (Smirnyagina et al. (1991), Biochimie 73, 587-598) und in vivo (Tomashevskaya et al. (1993), J. Gen. Virol. 74, 2717-2724) stark er-

höht. Die getrennten sgRNAs werden in PVX-Infektion für die MPs und CP-Expression produziert, die 3'-co-terminal mit der genomischen RNA sind ([Fig. 1](#)) (Mozorov et al. (1991), J. Gen. Virol. 72, 2039-2043). Die genauen Grenzen für die PVX-sgPrs sind unbekannt, es wurde jedoch experimentell gezeigt, dass die 81 nt-Sequenz, die 15 5'-terminale Nucleotide des PVX-CP-Gens umfasst, und 66 nt-stromaufwärtige Sequenz in vivo als sgPr aktiv ist (Chapman et al. (1992), Plant J. 2, 549-557). Kürzlich wurden die PVX-basierenden Vektoren mit diesem konstruierten 81-nt-langen sgPr für die transiente Expression des Pathogene-Elicitor-Gens und der Plant-Defence-Gene verwendet (Rommens et al. (1995), Plant Cell 7, 249-257). US 5 633 447 beschreibt ein DNA-Konstrukt, das einen subgenomischen Promotor an einem positiv-strängigen RNA-Virus und ein interessierendes Gen in Negativ-Sense-Orientierung aufweist. Die Verwendung von Pflanzen-RNA-Viren zur Einführung und Expression nicht-viraler Fremd-Gene in Pflanzen wurde durch die vorstehend zitierten Referenzen sowie durch French et al. (1986) (Science 231, 1294-1297) gezeigt. Alle diese viralen Vektoren waren jedoch zur autonomen Replikation in Pflanzenzellen fähig, und stellen deshalb ein Risiko für Zellpathogenese in einer für Wildtyp-Virus-typischen Weise dar. Ein anderer Nachteil von selbst-replizierenden RNA-Vektoren ist es, dass sie für die Aufrechterhaltung nicht-viraler Sequenzen nicht stabil sind (Donson et al. (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 7204-7208).

[0006] Obwohl ein ausgeprägtes Bedürfnis zur Verbesserung der Expression von Fremd-Proteinen, wie z.B. industriellen Enzymen, Arzneimitteln usw. in Pflanzen besteht, existieren einige technische Probleme. In erster Linie sind die Expressionsniveaus von Proteinen in Pflanzen unzulänglich. Die vorliegende Erfindung zielt darauf ab, diese Nachteile zu überwinden.

Zusammenfassung der Erfindung

[0007] Die Erfindung stellt eine Methode zur Expression einer in Pflanzenzellen oder in einer Pflanze zu exprimierenden Gen-Sequenz nach Anspruch 1 bereit. Die Erfindung stellt auch ein rekombinantes DNA-Molekül nach Anspruch 12 und eine eukaryotische Zelle nach Anspruch 13 bereit.

[0008] Die vorliegende Erfindung richtet sich auf die Super-Expression von Fremd-Genen in transgenen Zellen durch Kombinieren, innerhalb eines einzigen cDNA-Konstrukts und entsprechenden RNA-Transkripts, mehrerer trans- und cis-wirkender genetischer Elemente viralen Ursprungs, die konzentriert wirken, um die folgenden funktionellen Vorgänge auszulösen: a) das primäre chimäre kontinuierliche RNA-Transkript wird durch transformierte Zellen aus einem Pflanzen-exprimierbaren Promotor (35S-Pro-

motor) produziert ([Fig. 2](#)); b) durch direkte Translation des 5'-proximalen Gens eines einzigen kontinuierlichen primären Transkripts produzierte RNA-Replikase synthetisiert sekundäre monocistronische ([Fig. 3A](#)) (oder dicistronische ([Fig. 3B](#))) mRNA als Ergebnis der Transkription aus sgPr-Sequenz. Die Expression des 5'-proximalen Gens dieser mRNAs wird durch die $\alpha\beta$ -Leader-Sequenz verstärkt. Translation des 5'-distalen Gens von dicistronischer mRNA ([Fig. 3B](#)) wird durch die interne Ribosomen-Eingangspositions-(internal ribosome entry site)(IRES)-Sequenz, abgeleitet vom vorstehend erwähnten Tobamovirus crTMV gefördert; c) es ist wahrscheinlich, dass zumindest ein Teil der aus sgPr stammenden RNA-Transkripte an ihrem 3'-Ende die Minus-Kopie des RNA-Replikase-Gens und den genomischen Promotor für plus-RNA-Synthese umfasst ([Fig. 3A](#) und B). Es ist zu erwarten, dass in einer transgenen Zelle produzierte RNA-Replikase mit der 3'-terminalen Sequenz dieser RNA (genomischer Promotor) bindet, wobei bei Transkription die das Plus-Polarity-Replikase-Gen am 5'-Ende tragenden RNA-Moleküle produziert werden. Die Translation dieser mRNAs ergibt die Produktion zusätzlicher Replikase in transgenen Pflanzen ([Fig. 4](#)).

Kurze Beschreibung der Figuren

[0009] [Fig. 1](#) Schematische Darstellung des PVX-Genoms. Es werden die entsprechenden subgenomischen RNAs dargestellt.

[0010] [Fig. 2\(A\)](#) Schematische Darstellung des Expressions-aktivierenden Elements 1. 35S und CaMV PAS bezeichnen Blumenkohlmosaikvirus 35S-Promotor bzw. Polyadenylierungssequenz. PL bezeichnet Polylinker. (+) und (-) bezeichnen PVX-abgeleitete Sequenzen, die identisch bzw. komplementär mit den PVX-Virion-RNA-Sequenzen sind.

[0011] [Fig. 2\(B\)](#) Schematische Darstellung des Expressions-aktivierenden Elements 2. 35S und CaMV PAS bezeichnen Blumenkohlmosaikvirus 35S-Promotor bzw. Polyadenylierungssequenz. (+) und (-) bezeichnen PVX-abgeleitete Sequenzen, die identisch bzw. komplementär mit den PVX-Virion-RNA-Sequenzen sind. NPT bezeichnet NP-TII-Gen.

[0012] [Fig. 2\(C\)](#) Schematische Darstellung des Expressions-aktivierenden Elements 3. 35S und CaMV PAS bezeichnen Blumenkohlmosaikvirus 35S-Promotor bzw. Polyadenylierungssequenz. (+) und (-) bezeichnen PVX-abgeleitete Sequenzen, die identisch bzw. komplementär mit den PVX-Virion-RNA-Sequenzen sind. NPT bezeichnet NP-TII-Gen. IRES bezeichnet interne Ribosomen-Eingangsposition von Crucifereae-Tobamovirus. 2-5A POL und $\alpha\beta$ bezeichnen Säuger-2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase-Gen bzw. Kartoffelvirus X- $\alpha\beta$ -geno-

mische Leader-Sequenz.

[0013] Fig. 2(D) Schematische Darstellung des primären Transkripts des Expressions-aktivierenden Elements 2. Die Abkürzungen werden wie in Fig. 2(B) verwendet.

[0014] Fig. 2(E) Schematische Darstellung des primären Transkripts des Expressions-aktivierenden Elements 3. Die Abkürzungen werden wie in Fig. 2(C) verwendet.

[0015] Fig. 3(A) Schematische Darstellung des sekundären Transkripts des Expressions-aktivierenden Elements 2. Die Abkürzungen werden wie in Fig. 2(C) verwendet.

[0016] Fig. 3(B) Schematische Darstellung des sekundären Transkripts des Expressions-aktivierenden Elements 3. Die Abkürzungen werden wie in Fig. 2(C) verwendet.

[0017] Fig. 4(A) Schematische Darstellung des tertiären Transkripts des Expressions-aktivierenden Elements 2. Die Abkürzungen werden wie in Fig. 2(B) verwendet.

[0018] Fig. 4(B) Schematische Darstellung des tertiären Transkripts des Expressions-aktivierenden Elements 3. Die Abkürzungen werden wie in Fig. 2(C) verwendet.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0019] Um Unklarheiten im Hinblick auf die Absicht oder den Rahmen ihrer Verwendung auszuschalten, werden die folgenden Definitionen angegeben. Expression bezieht sich auf die Transkription und Translation eines Gens, wodurch ein Protein synthetisiert wird. Super-Expression bedeutet eine mindestens mehrfach höhere Expression als die Expression unter normalen Bedingungen. Promotor bezieht sich auf die Sequenz am 5'-Ende eines Struktur-Gens, die die Initiierung der DNA-Transkription lenkt. Promotor-Sequenzen sind notwendig, um die Expression des (der) stromabwärtigen Gens (Gene) zu betätigen. Eukaryotische (einschließlich pflanzenspezifische) Promotoren enthalten im allgemeinen die TA-TA-Box von ca. 10 bis 35 bp 5' zur Transkriptions-Startposition. 35S-Promotor bezieht sich auf einen Pflanzenexprimierbaren Blumenkohlmosaikvirus-Promotor, der die TATA-Box und andere Sequenzen, die für die maximale Effizienz der Transkription verantwortlich sind, bereitstellt. Dieser Promotor könnte auch als Transkriptions-rekombinanter Promotor für eine Gen-Expression in monocotyledonen Pflanzen (Last et al., europäisches Patent EP 0 459 643 A2 (91 304 205.7)) und Pflanzen-anaerobisches regulatorisches Element (Peacock et al., europäisches Patent EP 0 278 658 (A2) (Nr. 88 300

852.6) dienen.

[0020] In dieser Erfindung werden DNA-Segmente und neue Strategien zur Erhöhung der Expression gewünschter Gene in Pflanzen werden in dieser Erfindung beschrieben. Das erste dieser Expressions-segmente repräsentiert einen unikalen Transkriptionsmodul (unter der Kontrolle des pflanzenspezifischen Promotors), der ein PVX-Replikase-Gen an der 5'-proximalen Position (in Sense-Orientierung), gefolgt von sgPr von PVX (in Antisense-Orientierung) an eine Polylinker-Sequenz gebunden, umfasst. Das zweite Element enthält einen zusätzlichen Translationsverstärker von PVX ($\alpha\beta$ -Leader-Sequenz) zwischen sgPr und Polylinker, der für die höhere Gen-Expression sorgt. Das dritte Element enthält zusätzlich zum zweiten Element eine interne Ribosomen-Eingangssposition (IRES) zur Ausbildung von dicistronischen mRNAs, die zur Co-Expression des Gens von Interesse fähig ist, so dass unter dem $\alpha\beta$ -Verstärker und IRES-kontrollierten selektierbaren Marker-Gen platziert werden kann, und so die Selektion geeigneter transgener Pflanzenlinien signifikant vereinfacht. Die beschriebenen Expressions-aktivierenden Elemente und die DNA-Moleküle, die diese enthalten, sind als Methode für eine erhöhte Expression der Gene in einem Pflanzengewebe geeignet.

[0021] Kürzlich wurde ein Verfahren zur Herstellung eines exogenen Gens oder seines Produkts in einer Pflanzenzelle vorgeschlagen, das umfasst: Insertieren in ein Genom einer Pflanze; a) cDNA von Replikase-Gen aus RNA-Pflanzenvirus und b) cDNA aus einer rekombinanten Virus-genomischen RNA, in der die Nucleotid-Einheit an und nach ATG stromabwärts vom ursprünglichen Translations-Initiations-Codon (das erste ATG zählt vom 5'-Ende) in der cDNA des CP-Gens durch ein gewünschtes exogenes Gen ersetzt ist; oder Inokulieren einer Pflanzenzelle, die cDNA eines Replikase-Gens eines Pflanzenvirus umfasst, mit aus der cDNA der rekombinanten Virus-genomischen RNA synthetisierter RNA (Mori et al., EPO-Patentanmeldung EP 0 573 767 A1). Im Gegensatz zur vorliegenden Erfindung zur Expression eines exogenen Gens schlägt die zitierte Anmeldung vor, zwei cDNA-Konstruktionen zu verwenden: cDNA von Replikase-Gen und eine rekombinante Virus-genomische RNA, worin exogenes Gen anstelle eines natürlichen CP-Gens vorhanden ist. Dieser Versuch ist mühsam und schwierig in die Praxis umzusetzen, weil er eine doppelte Pflanzenzellen-Transformation erfordert. In der vorliegenden Erfindung ist nur eine Pflanzenzellen-Transformation erforderlich.

[0022] Viraler subgenomischer Promotor für die heterologe Gen-Expression wurde von Gerlach et al. verwendet (PCT WO 91/13994), der eine Nucleinsäure-Sequenz vorgeschlagen hat, umfassend: (a) einen Transkriptions-Promotor; (b) eine heterologe Gen-Sequenz, die an den Transkriptions-Promotor

operativ gebunden ist; und (c) einen mit der heterologen Gen-Sequenz verknüpften sgPr. Die vorgeschlagene cDNA-Konstruktion enthält heterogenes Gen in Antisense-Orientierung, umfasst aber im Gegensatz zur vorliegenden Erfindung nicht das viral-abgeleitete Replikase-Gen.

[0023] Die besonderen Vorteile der vorliegenden Erfindung gegenüber dem Stand der Technik einer Super-Expression von Proteinen sind deshalb: 1) höhere Ausbeuten; 2) leichtere Methoden zur Proteinbestimmung und -isolierung; 3) die Produktion von Proteinen nicht nur im Laboratorium, sondern auch unter industriellen Bedingungen.

[0024] Virale sgPrs (einschließlich solchen von PVX) in viralen RNA-Genomen enthalten ein Set von Consensus-Sequenzen, die für eine bestimmte Virusgruppe spezifisch sind (siehe z.B. Solovye et al. (1994), J. Gen. Virol. 75, 259-267). Alle bekannten sgPrs wirken nur beim RNA-Niveau. Antisense-Orientierung von RNA-Segmenten bezieht sich auf die zur translatierten mRNA komplementäre RNA. Chimäre Sequenzen oder Konstrukte beziehen sich auf eine von mindestens zwei heterologen Teilen abgeleitete Nucleotid-Sequenz. Die Produktion von genetisch modifiziertem Pflanzengewebe, das ein Protein von Interesse unter der Kontrolle eines Expressions-aktivierenden Elements und eines stromaufwärtigen pflanzenspezifischen Promotors exprimiert, kombiniert die spezifischen Punkte der vorliegenden Beschreibung mit einer Vielzahl von auf diesem Gebiet bekannten Techniken und Vorteilen. In den meisten Fällen existieren für jede Stufe des Gesamtverfahrens alternative Methoden. Die Wahl der Methoden hängt von Variablen ab, wie z.B. vom Vektor-System für die Einführung und stabile Aufrechterhaltung des Expressions-aktivierenden-Element-pflanzenspezifischen-Promotor-Polyadenylierungssignals, der zu modifizierenden Pflanzenspezies und der gewünschten Regenerationsstrategie, dem RNA-Polymerase-Gen, sgPr und dem zu verwendenden bestimmten Gen von Interesse. Obwohl z.B. der Ausgangspunkt zum Erhalt des Expressions-aktivierenden Elements in der vorliegenden Anmeldung durch das PVX-RNA-Replikase-Gen exemplifiziert ist, können ebenfalls sorgfältig ausgewählte andere Replikase-Gene aus verschiedenen Pflanzenviren verwendet werden. Deshalb kann subgenomischer Promotor sgPr von 25K-Protein-Gen ([Fig. 1](#)) des Hüll-Protein-Gens durch andere verwandte Promotoren ersetzt werden. Wichtig ist es, zu unterstreichen, dass das Expressionssystem unter sehr verschiedenen Bedingungen angewandt werden kann, einschließlich dem Züchten von Pflanzen auf dem Feld oder dem Züchten von Pflanzen in Klimakammern oder von Algenzellen und anderen Pflanzenzellen in Fermentern.

[0025] Eine Anwendung der Erfindung ist es, die

synthetisierten Proteine in Vakuolen, Cytoplasma oder interzellulärem Raum zu lokalisieren, indem man eine geeignete Signal-Peptid-Sequenz verwendet, um die Proteine in den gewünschten Platz zu überführen.

[0026] Die Erfindung kann auch für die Super-Expression verschiedener Proteine angewandt werden: a) das tierische RNA-bindende Protein, um eine nicht-spezifische Resistenz gegenüber verschiedenen DNA- und RNA-enthaltenden Viren zu erzielen; b) das normale und defekte Pflanzenvirus-abgeleitete CP, Movement-Protein oder Replikase zum Bereitstellen einer Pflanzenvirus-Resistenz; c) Pflanzenproteine, wie z.B. Thaumatin; d) essentielle Aminosäure-reiche Proteine, die den Nährwert von Pflanzenerträgen verbessern; e) medizinisch brauchbare Proteine, wie z.B. Antikörper und Interferon; f) Enzyme, wie z.B. Amylasen, Zellulasen, Proteasen, Lipasen.

[0027] Es sollte auch verstanden werden, dass geringere Sequenzvariationen innerhalb der in der vorliegenden Erfindung verwendeten oder beschriebenen Sequenzen möglich sind. Diese Variationen können durch Standardverfahren bestimmt werden. Weil verbesserte Mittel für die stabile Insertion von Fremd-Genen in Pflanzenzellen und zur Manipulation der modifizierten Zellen entwickelt wurden, ist ein Fachmann auf diesem Gebiet dazu fähig, unter diesen alternativen Stufen auszuwählen, um ein gewünschtes Ergebnis zu erhalten. Die Verfahren zur in vivo-Kultur und eventuellen Regeneration in ganze Pflanzen kann Stufen beinhalten zum Auswählen und Bestimmen von transformierten Pflanzenzellen (siehe nachstehend, BEISPIELE). Solche alternativen Maßnahmen umfassen auch Elektroporation, Teilchenbeschuss, Mikroinjektion und direkte DNA-Transformation sowie eine bevorzugte Ausführungsform, d.h., die Verwendung von T-DNA-enthaltenden Vektoren und agrobakteriell-mediierter Transformation.

[0028] Die Verfahren der vorliegenden Erfindung erweitern den Bereich von Pflanzenzellen, in denen Expressions-aktivierende Elemente eingeführt werden können, beträchtlich. Ein Hauptmerkmal der vorliegenden Erfindung in ihrer bevorzugten Ausführungsform ist ein rekombinantes Plasmid, das einen inserierten pflanzenspezifischen Promotor aufweist und ein Polyadenylierungssignal, die die Transkription des viralen Replikase-Gens (In-Sense-Orientierung) und heterologen Gens (Gene) von Interesse (in Antisense-Orientierung) lenkt, dessen Expression durch Transkriptions-Aktivierung von viralem sgPr und durch Translations-Aktivierung von PVX- $\alpha\beta$ -Sequenz gelenkt ist ([Fig. 2-4](#)). Es wurde festgestellt, dass die Translations-Aktivierung am effektivsten ist, wenn das Gen von Interesse unmittelbar 3' zur $\alpha\beta$ -Sequenz in dem entsprechenden translatierbaren Transkript

platziert ist (**Fig. 3**). Um signifikante Unterschiede in den Expressionsraten der interessierenden Gene in verschiedenen Pflanzenlinien zu vermeiden, kann das selektive Marker-Gen unter der Kontrolle von IRES an die 3'-Seite des Transkripts inseriert werden.

[0029] Die folgenden Gründe werden nur zu veranschaulichenden Zwecken angegeben und sollen den Rahmen der Erfindung nicht beschränken. In der transgenen Pflanze lenkt das einzige cDNA-Konstrukt die Synthese des entsprechenden durch 35S-Promotor und Polyadenylierungssignal (PAS) des Blumenkohlmosaikvirus kontrollierten primären RNA-Transkripts (Odell et al. (1985), *Nature* 313, 810-812) (**Fig. 2C**). Das primäre chimäre RNA-Transkript umfasst das PVX-Replikase-Gen am 5'-Ende (**Fig. 2E**). Durch direkte Translation des 5'-proximalen Gens eines einzigen kontinuierlichen primären Transkripts produzierte RNA-Replikase synthetisiert sekundäre dicistronische mRNA als Ergebnis der Transkription von sgPr-Sequenz (**Fig. 3B**). Die Expression des 5'-proximalen Gens (Säuger-2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase-Gen; Truve et al. (1993), *Biotechnology* 11, 1048-1052) dieser dicistronischen mRNA wird durch den $\alpha\beta$ -Leader verstärkt (Tomashevskaya et al. (1993), *J. Gen. Virol.* 74, 2717-2724). Die Translation des 5'-distalen Gens (selektives Marker-NPTII-Gen) von dicistronischer mRNA (**Fig. 3B**) wird durch von crTMV-Tobamovirus abgeleitetem IRES gefördert (Dorokhov et al. (1994), *REBS Letters* 350, 5-8). Als Ergebnis können transformierte Keime, die das sekundäre Transkript (**Fig. 3B**) exprimieren, leicht durch Züchten auf dem Kanamycin-enhaltenden Medium selektiert werden. Die entsprechenden Kanamycin-resistenten Pflanzen produzieren ebenfalls 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase (**Fig. 3B**), indem ihnen die Resistenz gegenüber Virusinfektion übertragen wird (Truve et al. (1993), *Biotechnology* 11, 1048-1052). Es ist zu erwarten, dass die in transgenen Zellen produzierte PVX-RNA-Replikase mit der 3'-terminalen Sequenz der sekundären RNA bindet (**Fig. 3B**), die den PVX-genomischen Promotor für plus-RNA-Synthese repräsentiert, wodurch nach Transkription die RNA-Moleküle, die das plus-Polaritäts-Replikase-Gen am 5'-Ende tragen, produziert werden (**Fig. 4**). Translation dieser mRNAs ergibt die Produktion von zusätzlicher Replikase in einer transgenen Pflanze.

BEISPIELE

[0030] Diese Beispiele beschreiben das Klonieren, die Pflanzenzellen-Elektroporation, Teilchenbeschuss und Versuchsstrategie zur Untersuchung der durch PVX-sgPr und Replikase mediierten GUS-Gen-Regulation und -Expression.

Beispiel 1: Konstruktion von Plasmiden, die PVX-Replikase-Gen, GUS-Gen und PVX-sgPr enthalten

[0031] Nach Maniatis et al. (1982), *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, wurden Standard-Molekularbiologieverfahren durchgeführt. Alle in der Erfindung verwendeten Plasmide können nach den Vorschriften der Beschreibung von einem Fachmann auf diesem Gebiet ohne ungebührliche experimentelle Arbeit unter Verwendung von auf diesem Gebiet leicht erhältlichen Materialien hergestellt werden.

[0032] Das PVX-cDNA-Klon pBS 118 voller Länge (Morozov et al. (1990), *Biochimie* 72, 677-684) wurde zur PCR-Amplifikation des RdRp-Gens mit PVX-spezifischen Primern PVXpol5 (entsprechend den Resten 1 bis 24 von PVX-Genom) und PVXpol3 (entsprechend den Resten 4421-4451, und die künstliche Kpn 1-Stelle am 5'-Terminus aufweisend) verwendet. Das resultierende PCR-Fragment wurde mittels Mun 1 und Kpn 1 gespalten und an EcoRI-KpnI-gespaltenem pRT 101 ligiert (Topfer et al. (1987), *Nucleic Acids Res.* 15, 5890) und ergab pRTX-Pol. Das pBS 118-Klon wurde ebenfalls für eine PCR-medierte Amplifikation von PVX-sgPr verwendet. Die Reaktion wurde durch die Primer PVX-SGXba (entsprechend den Resten 5241-5265 von PVX-Genom) und PVX-SGNco (komplementär zu den Resten 5625-5651 und eine künstliche NcoI-Position am 5'-Terminus aufweisend) gelenkt. Das Plasmid pTZ-G 12-Derivat von pT'Z18R (Zelenina et al. (1992), *FEBS Letters* 296, 267-270) wurde zur PCR-Amplifikation vom β -Glucuronidase(GUS)-Gen verwendet. Die Reaktion wurde durch universellen Reverse-Sequenzierungs-Primer und dem zum 3'-Ende des GUS-Gens komplementären und künstliche Kpn 1-Position aufweisenden Primer (24-mer) gelenkt. Dann wurden die PVX-sgPr und GUS-Gen entsprechenden PCR-Produkte mit Nco 1 gespalten und an einander ligiert. Das der Fusion des sgPr-GUS-Gens entsprechende Ligationsprodukt wurde aus Agarose-Gel isoliert, mit Xba 1 und Kpn 1 gespalten und am Xba 1-Kpn 1-gespaltenem pRTX-Pol ligiert und ergab pRTX-PSG.

Beispiel 2: Protoplast-Isolierung und Kultur

[0033] Die Isolierung von Mesophyll-Protoplasten aus Gerstenblättern wurde nach Zelenina et al. (1992) (*FEBS Lett.* 296, 276-270) durchgeführt. Die Protoplasten wurden in 0,375 M Mannit, 10 mM MES, pH 5,8, 205 mM NaCl, 3,5 KCl, 94 mM MgSO₄, 8,4 mM MgCl₂, 3,4 mM CaCl₂ und 0,875 mM NaHCO₂ gewaschen. Die Protoplasten wurden wieder sedimentiert, gewaschen, sedimentiert und in TBS9 (Tris 3,63 g/l, CaCl₂·2H₂O 876 mg/l, NaCl 8,78 mg/l, Mannit 50 g/l, pH 9,0) in einer Konzentration von 2×10^6 Protoplasten/ml resuspendiert.

Beispiel 3: Elektroporation von Protoplasten

[0034] Unmittelbar vor der Elektroporation wurden 100 µl Protoplasten-Suspension einem Zentrifugenrohr zugegeben, das 5 µl Plasmid-DNA, gelöst in 5 µl 10 mM Tris HCl, pH 8,0, 1 mM Na₂EDTA, enthielt. Die Mischung wurde in der Elektroporationskammer (2 mm zwischen Elektroden) überführt und drei Pulse von 275 V (1375 V/cm) mit einer Pulsbreite von 5 ms und einer Verzögerung von 100 ms wurden zwischen Elektroden aus einem 24 µF-Kondensator appliziert. Nach 5-sekündigem Erholen lassen der Protoplasten wurde die Protoplast-Suspension in ein Mikrozentrifugenrohr rückpipettiert, und 600 µl Waschlösung zugegeben. Die Röhrchen wurden leicht (< 100 g) 5 Minuten lang zentrifugiert, die Überstände entfernt und die Protoplasten in 1 ml M-S-Kulturmedium resuspendiert. Die Protoplasten-Suspension wurde in 35 mm-Petrischalen überführt, die in Parafilm verschlossen wurden, und bei 25°C im Dunklen inkubiert, um Expression des GUS-Gens zu ermöglichen.

Beispiel 4: Versuch einer GUS-Gen-Expression in elektroporierten Protoplasten

[0035] Nach Inkubation während 44 bis 48 Stunden wurden 400 µl Waschlösung (0,3 M Mannit, 156 mM NaCl, 3,5 mM KCl, 9,4 mM MgSO₄, 8,4 mM MgCl₂, 3,4 mM CaCl₂, 0,9 mM NaHCO₃, pH 6,0) jeder Schale zugegeben, und jede Protoplast-Probe wurde in ein Mikrozentrifugenrohr pipettiert. Die Röhrchen wurden bei 100 × g 8 Minuten lang zentrifugiert und der Überstand verworfen. Protoplast-Pellets wurden entweder bei -80°C gelagert, bis sie benötigt wurden, oder sofort verwendet. Jedes Pellet wurde mit Hilfe eines Vortex-Mischers in 250 µl-Extraktionspuffer resuspendiert (Jefferson et al. (1987), Plant Molecular Biology Report 5, 387-405). Die Proben wurden auf Eis 5 Sekunden lang unter Verwendung eines Labsonic 1510-Sonikators, eingestellt auf 55 W, ausgestattet mit einer Mikrospeitzensonde, beschallt. Trümmer wurden durch Zentrifugieren in einer Mikrozentrifuge während 1 Minute pelletisiert und der klare Überstand wurde auf Gesamt-Protein unter Verwendung eines Bio-Rad-Kits nach den Vorschriften des Herstellers untersucht. Für jedes Set an Konstrukten wurde der fluorometrische GUS-Assay (Jefferson et al. (1987), Plant Molecular Biology Report 5, 387-405) mit einem aliquoten Teil des Überstandes, der eine bestimmte Menge des Gesamt-Proteins im Bereich von 5 bis 50 µg in 100 µl Lysepuffer gelöst, enthielt, durchgeführt. Weitere 100 µl Extraktionspuffer, enthaltend 2 mM 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronid (MUG), wurden zugegeben, die Mischung wurde kurz mit dem Vortex-Mischer behandelt und bei 37°C während einer festgesetzten Zeit im Bereich von 20 bis 160 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1.000 µl 0,2 M Na₂CO₃ beendet und die Fluoreszenz bei 455 nm unter Verwendung eines Perkin-Elmer-Spektrofluorimeters, eingestellt bei einer Anre-

gunungswellenlänge von 365 nm, gemessen.

Beispiel 5: Teilchenbeschuss und Test der GUS-Aktivität in Pflanzen

[0036] Der Teilchenbeschuss wurde unter Verwendung einer Schwungscheibenmethode (flying disk method) (siehe z.B. Daniell (1993) Methods in Enzymology 217, 527-557) mit einer PDS-1000-Vorrichtung auf Hochdruck-Helium-Basis (Bio-Rad) durchgeführt. Für jede Beschussserie wurde DNA auf Wolframteilchen mit Calciumchlorid und Ethanol nach Zugabe, unter Mischen mit einem Vortex-Mischer, von 10 µl Plasmid-DNA (bei 0,5 bis 1,5 mg/ml bis 6 mg Wolframteilchen, suspendiert in 100 µl 50%igem Glycerin) ausgefällt, und die Wolframteilchen dann in Suspension in kaltem 95%igem Ethanol (90 mg/ml) gehalten. Nach Beschallung wurden 5 µl dieser Mischung sofort auf eine Kunststoff-Schwungscheibe (plastic flying disc) platziert, und nach Trocknen der Teilchen zum Beschuss verwendet. Ein abgelöstes Blatt von *Nicotiana benthamiana* (15-30 mm groß) wurde in das Zentrum einer Kunststoff-Petrischale gegeben und auf einem festen Träger bei einer Zieldistanz von 7 cm beschossen. Der Beschuss wurde mit einem Impuls von 1350 kPa Heliumgas in einer Vakuumkammer durchgeführt.

[0037] Inokulierte Blätter wurden 24 bis 72 Stunden nach Beschuss entnommen. PVX-Replikase und sgPr-Aktivität wurden durch histochemische Bestimmung der GUS-Expression (Jefferson et al. (1987), Plant Molecular Biology Report 5, 387-405) verfolgt. Proben wurden in das kolorimetrische GUS-Substrat infiltriert, modifiziert (De Block und Debrouwer (1992), Plant J. 2, 261-266), um die Diffusion der Zwischenprodukte der Reaktion zu begrenzen: 0,115 M Phosphat-Puffer, pH 7,0, enthaltend 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-glucuronid (X-Gluc) 600 µg/ml; 3 mM Kaliumferricyanid; 10 mM EDTA. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Blätter in 70% Ethanol fixiert und mittels eines Lichtmikroskops untersucht.

Patentansprüche

1. Methode zur Expression einer in Pflanzenzellen oder in einer Pflanze zu exprimierenden Gensequenz, umfassend das Einführen eines rekombinanten DNA-Moleküls in Pflanzenzellen, wobei das rekombinante DNA-Molekül umfasst:

- (a) einen Transkriptionspromotor,
- (b) ein 3' zum Transkriptionspromotor befindliches von einem Virus abgeleitetes Replicasegen,
- (c) eine zu exprimierende Gensequenz,
- (d) eine subgenomische Promotorsequenz, die an die zu exprimierende Gensequenz gebunden ist, worin

die Replicase-Gensequenz eine Orientierung aufweist, die bei der Transkription ein primäres

RNA-Transkript ergibt, das die Replicase-Gensequenz in Positivsinn-Orientierung aufweist; und die zu exprimierende Gensequenz und die subgenomische Promotorsequenz in einer Orientierung sind, die bei der Transkription ein primäres RNA-Transkript ergibt, das die zu exprimierende Gensequenz und die subgenomische Promotorsequenz in Negativsinn-Orientierung aufweist.

2. Methode nach Anspruch 1, worin der Transkriptionspromotor ein eukaryotischer Promotor ist.

3. Methode nach Anspruch 2, worin der Transkriptionspromotor ein pflanzenspezifischer Promotor eines Pflanzenvirus ist.

4. Methode nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin das Replikatgen ein pflanzenspezifisches Replicase-Gen eines Pflanzenvirus ist.

5. Methode nach einem der Ansprüche 1 bis 4, worin die subgenomische Promotorsequenz ein pflanzenspezifischer subgenomischer Promotor eines pflanzenviralen Ursprungs ist, der dazu fähig ist, mit einer aus dem Replicase-Gen exprimierten Replicase in Wechselwirkung zu treten.

6. Methode nach einem der Ansprüche 1 bis 5, worin die zu exprimierende Gensequenz ein gewünschtes Polypeptid-Produkt kodiert, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: Antibiotika, Toxine, Hormone, Enzyme, mikrobielle Proteine und tierische Proteine.

7. Methode nach einem der Ansprüche 1 bis 5, worin die zu exprimierende Gensequenz ein Polypeptid-Produkt kodiert, das eine Virusinfektion beeinflusst oder das eine Eigenschaft modifiziert, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: Pheo-Typ, Sterilität, Salztoleranz, Virusanfälligkeit, Dürre-Toleranz, Azidität und Farbe einer Pflanze; oder das Polypeptid-Produkt ein bestimmbares Signal erzeugt.

8. Methode nach einem der Ansprüche 1 bis 7, die zusätzlich ein Gen umfasst, das einen selektierbaren Marker kodiert, der Antibiotika-Resistenz, Herbizid-Resistenz, Farbveränderung verleiht, oder das ein Polypeptid kodiert, das fähig ist, mit einem Substrat unter Bildung eines bestimmbaren Signals zu reagieren.

9. Methode nach einem der Ansprüche 1 bis 8, die zwischen dem Replicase-Gen und der zu exprimierenden Gensequenz eine weitere unter der Kontrolle einer internen Ribosomen-Eingangssposition (IRES) zu exprimierende Gensequenz enthält, wobei die weitere zu exprimierende Gensequenz und IRES eine Orientierung aufweisen, die bei der Transkription ein primäres RNA-Transkript ergibt, das eine wei-

tere zu exprimierende Gensequenz und IRES in Negativsinn-Orientierung aufweist.

10. Methode nach einem der Ansprüche 1 bis 9, die zusätzlich die $\alpha\beta$ -Leader-Sequenz von PVX-Virus als Translations-verstärkende Nucleotid-Sequenz umfasst, die sich zwischen der Transkriptions-Initiierungsposition der subgenomischen Promotorsequenz und dem 5'-Ende der zu exprimierenden Gensequenz befindet.

11. Methode nach einem der Ansprüche 1 bis 10, worin das Replicase-Gen, die zu exprimierende Gensequenz und die subgenomische Promotorsequenz unter der Wirkung des Transkriptionspromotors transkribiert werden, um ein primäres Transkript zu ergeben, das dazu fähig ist, unter der Wirkung der aus dem Replicase-Gen exprimierten Replicase und dem subgenomischen Promotor transkribiert zu werden, um ein sekundäres Transkript zu ergeben.

12. Rekombinantes DNA-Molekül, wie in einem der Ansprüche 1 bis 10 definiert.

13. Eukaryotische Zelle, transformiert mit dem rekombinanten DNA-Molekül nach Anspruch 12.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

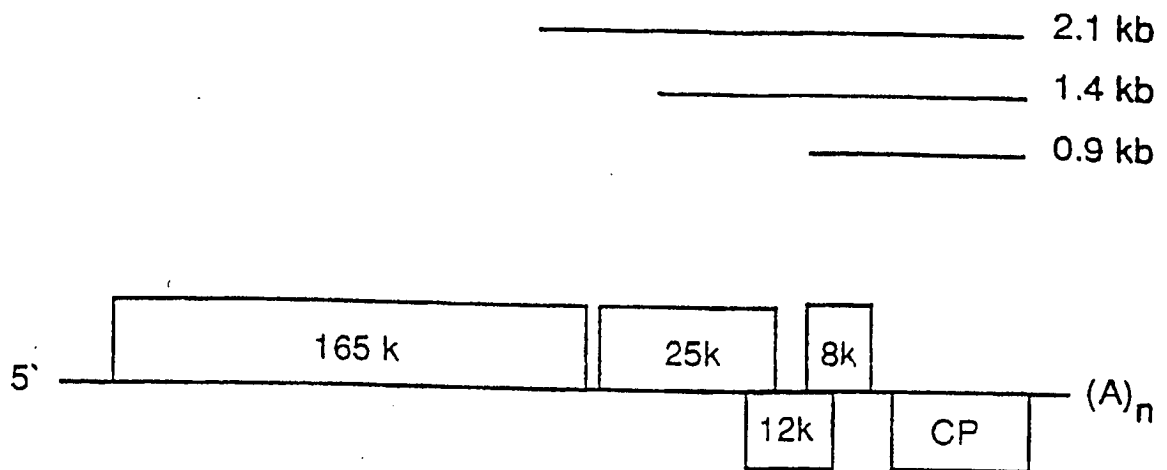


Fig. 1

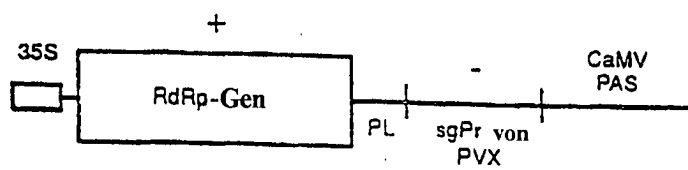


Fig. 2A

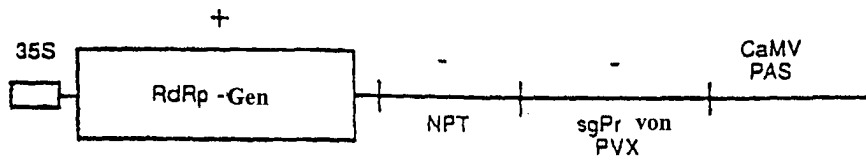


Fig. 2B

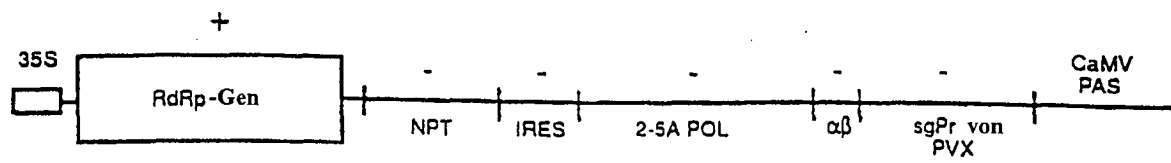


Fig. 2C

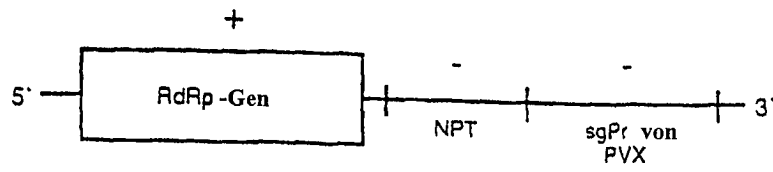


Fig. 2D

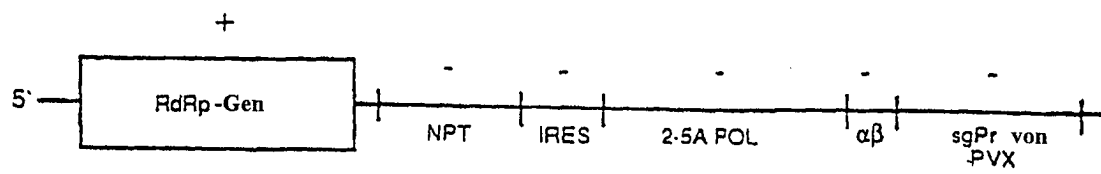


Fig. 2E

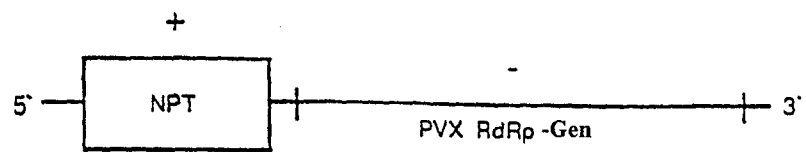


Fig. 3A

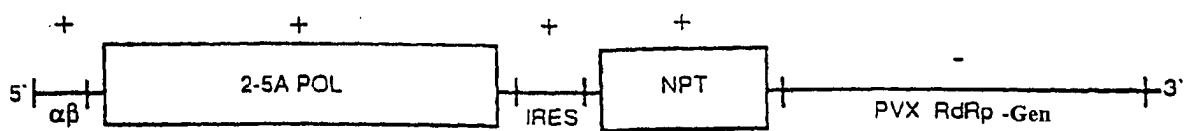


Fig. 3B

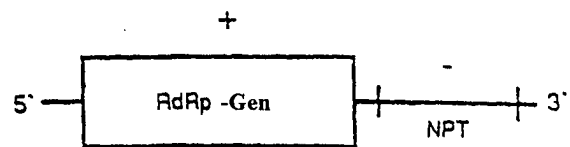


Fig. 4A

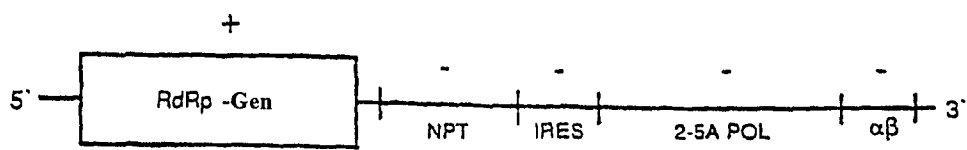


Fig. 4B