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

(10) **DE 600 27 570 T2** 2007.02.15

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 200 557 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 27 570.1**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/21461**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 952 574.2**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/011020**
(86) PCT-Anmeldetag: **07.08.2000**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **15.02.2001**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.05.2002**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **26.04.2006**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **15.02.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 5/04*** (2006.01)
C12N 15/05 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
147445 P **05.08.1999** **US**

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

(73) Patentinhaber:
Icon Genetics, Inc., Princeton, N.J., US

(74) Vertreter:
Samson & Partner, Patentanwälte, 80538 München

(72) Erfinder:
KLIMYUK, Victor, Norwich NIR4 7EG, GB;
KUCHUK, Nikolay V., Kiev 252179, UA

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG KÜNSTLICHER PFLANZENCHROMOSOMEN**

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

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

Beschreibung

TECHNISCHES GEBIET

[0001] Die Erfindung betrifft das Gebiet der molekularen Genetik und insbesondere die Herstellung von künstlichen Chromosomen, wie künstlichen Pflanzenchromosomen.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Für die Einführung und Expression von Genen in pflanzliche(n) und tierische(n) Zellen und insbesondere Pflanzenzellen sind mehrere Verfahren entwickelt worden. Diese Verfahren weisen zahlreiche Einschränkungen auf, insbesondere bei Berücksichtigung der Komplexität des Züchtungsverfahrens, welches für die Introgression von mehr als einigen wenigen Genen in Elitelinien und die Erzielung einer stabilen, vorhersagbaren Expression der individuellen Gene erforderlich ist. Die gegenwärtigen Verfahren zur Pflanzentransformation sind auf die Einführung von kleinen DNA-Segmenten, welche im Allgemeinen für die Expression von zwei bis drei Genen ausreichend sind, beschränkt. Mit der schnellen Zunahme der Sequenzierungsgeschwindigkeit und der Entdeckung von neuen Genen zur Modifizierung von agronomischen Merkmalen und zum Dirigieren von Pflanzen dahingehend, dass sie Material ausgehend von vollständig neuen Stoffwechselwegen produzieren, wird diese Einschränkung eine schwerwiegende Einschränkung darstellen. Zusätzlich führt das gegenwärtige Verfahren zum zufälligen Einführen von Genen in das Genom der Empfängerpflanze zu einem intensiven „Linkage Drag", was potentiell zur Zerstörung von wichtigen Genen führen und die Produktion von Elitelinien vereiteln kann.

[0003] Das künstliche Chromosom ist ein lineares DNA-Stück, das die gesamten notwendigen Elemente für eine stabile Replikation und Segregation enthält. Künstliche Chromosome sind für Hefe (Burke et al., Science 236: 806–812, (1987)), Bakterien (O'Connor et al., Science 244(4910): 1307–1312 (1989), Shizuya et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89(18): 8794–8797 (1992), Hosoda et al., Nucleic Acids Res. 18(13): 3863–3869 (1990)) und vor kürzerer Zeit für Tiere (Harrington et al., Nature Genetics 15: 345–355 (1998); Grimes und Cooke, Human Molecular Genetics 7(10): 1635–1640 (1998); und Ikeno et al., Nature Biotechnology 16: 431–439 (1998)) beschrieben worden. In diesen Fällen wurden die Chromosomen hergestellt, indem die erforderlichen Elemente identifiziert und diese dann manipuliert wurden, um ein Chromosom zu konstruieren, oder über in vivo- und in vitro-Manipulationen, welche eine Isolierung von einem oder mehreren chromosomalen Elementen umfassten.

[0004] Das U.S.-Patent 5,270,201 beschreibt Telomersequenzen aus Arabidopsis und die Verwendung von jenen Sequenzen, um ein künstliches Pflanzenchromosom zu konstruieren. Die Patentoffenbarung betrifft ein rekombinantes DNA-Molekül, welches das Telomer und gegebenenfalls das Zentromer eines höheren Eukaryoten enthält. Um ein funktionelles künstliches Chromosom gemäß den Lehren des Patents bereitzustellen, müssen die funktionalen Elemente eines Chromosoms zusammengefügt und damit eine Pflanzenzelle transformiert werden. Das in dem Patent exemplifizierte Element, das Telomer, ist das einfachste der erforderlichen Teile. Jedoch ist gegenwärtig bekannt, dass ein Pflanzen-Zentromer eine hochgradig komplexe Struktur aus wenigstens 360000 Basenpaaren ist. Vor kürzerer Zeit beschreibt die PCT-Anmeldung (WO 98/55637) die Identifizierung und Klonierung von funktionellen Pflanzen-Zentromeren basierend auf Arabidopsis.

[0005] Daher besteht auf dem Gebiet der landwirtschaftlichen Biotechnologie ein Bedarf an Verfahren zur Herstellung von künstlichen Pflanzenchromosomen, die eine weniger komplexe genetische Manipulation und Zusammenfügung von individuellen chromosomalen Elementen mit sich bringen.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0006] Die Anmelder haben Verfahren zur Herstellung von künstlichen Pflanzenchromosomen erfunden. Das Verfahren ist allgemein anwendbar auf eine jegliche Pflanzenspezies von Interesse, einschließlich Dikotyledone und Monokotyledone. Die Verfahren ziehen einen Vorteil aus der natürlichen Fähigkeit einer Pflanzenzelle, Schädigungen, die an deren Chromosomen aufgetreten sind, zu reparieren. Anstatt künstliche Chromosomen ausgehend von bekannten funktionellen chromosomalen Elementen, wie Zentromeren, Telomeren und autonom replizierenden Sequenzen, zu synthetisieren, setzt die Erfindung die normalen Stoffwechselfunktionen einer Pflanzenzelle ein, um alle notwendigen Verfahrensschritte, um funktionelle Minichromosomen zu erzeugen, auszuführen.

[0007] Ein erster Aspekt der Erfindung ist auf ein Verfahren zum Herstellen eines künstlichen Pflanzenchromosoms gerichtet. Es umfasst das Folgende: (a) Herstellen von rekombinanten Protoplasten von einer ersten Pflanzenspezies, welche eine exogene oder nicht-native Nukleinsäure (z.B. DNA) von Interesse enthalten; (b) Erzeugen von Chromosomenfragmenten von Chromosomen, die in den rekombinanten Protoplasten enthalten sind; (c) Fusionieren der rekombinanten Protoplasten von (b) mit Protoplasten einer zweiten Pflanzenspezies, um fusionierte Protoplasten zu erzeugen, wobei die erste und die zweite Pflanzenspezies gleich oder unterschiedlich sein können; und (d) Identifizieren von fusionierten Protoplasten von (c) oder von Zellen, die von den fu-

sionierten Protoplasten von (c) abgeleitet sind, die Chromosomenfragmente enthalten, welche normale pflanzenchromosomale Eigenschaften zeigen.

[0008] In einer anderen Ausführungsform wird das künstliche Pflanzenchromosom hergestellt durch die folgende Vorgehensweise:
(a) Erzeugen von transformierten Pflanzen von einer ersten Pflanzenspezies, welche eine exogene Nukleinsäure enthalten; (b) Erzeugen von Chromosomenfragmenten von Chromosomen von der ersten Pflanzenspezies; (c) Kreuzen der ersten Pflanzenspezies, welche die Chromosomenfragmente enthält, mit einer zweiten Pflanzenspezies, um hybride Pflanzenspezies zu erzeugen, wobei die erste und die zweite Pflanzenspezies gleich oder unterschiedlich sein können; und (d) Identifizieren von hybriden Pflanzenspezies von (c) oder von Zellen oder Protoplasten davon, welche wenigstens ein Chromosomenfragment, welches normale pflanzenchromosomale Funktionen zeigt, enthalten.

[0009] In bevorzugten Ausführungsformen werden Chromosomenfragmente durch Bestrahlen der Protoplasten oder durch Behandeln mit einem chemischen Mittel erzeugt. Fusionierte Protoplasten oder von den fusionierten Protoplasten abgeleitete Zellen, die Chromosomenfragmente, welche normale pflanzenchromosomale Eigenschaften zeigen, enthalten, werden durch Pulsfeldgelelektrophorese identifiziert. Die erste und die zweite Pflanze können Mitglieder derselben Spezies oder Familie sein oder sie können miteinander nicht verwandt sein. Die Verfahren sind anwendbar auf alle Pflanzen – Monokotyledone und Dikotyledone gleichermaßen.

[0010] In anderen bevorzugten Ausführungsformen enthält die exogene DNA wenigstens eine funktionale Stelle, wie eine Rekombinationsstelle, eine Restriktionsstelle und/oder eine kodierende Region. Im Allgemeinen werden selektierbare Markergene als Teil der kodierenden Region mit aufgenommen. Chromosomale Elemente aus Hefe, z.B. künstliche Hefechromosome, sind bevorzugt. In diesen Fällen, wobei die kodierende Region eine in einer Hefezelle funktionelle Zentromersequenz enthält, erzeugt das Verfahren der Erfindung ein Chromosomenfragment, welches eine andere Zentromersequenz, die in einer Pflanzenzelle funktionsfähig ist, ebenso wie auch die in einer Hefezelle funktionelle Zentromersequenz enthält. Diese DNAs werden zu einem rekombinanten oder Shuttle-Vektor umgebaut und werden verwendet, um transformierte oder rekombinante Pflanzen- oder Hefezellen zu erzeugen. Allgemeiner werden jedoch auch die künstlichen Pflanzenchromosome (PACs), die durch die gegenwärtig offenbarten Verfahren hergestellt werden, und Konstrukte und Zellen, die mit den PACs transformiert sind, bereitgestellt.

[0011] Ein anderer Aspekt der Erfindung ist auf vollständige Pflanzen, die durch die Verfahren, wie durch Regeneration der Pflanzen ausgehend von fusionierten Protoplasten, hergestellt werden, gerichtet. Isolierte Pflanzenzellen und Pflanzenzell- und Protoplastenkulturen werden auch offenbart.

[0012] Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist auf ein Verfahren zum Herstellen einer transgenen Pflanze gerichtet. Dieses Verfahren umfasst: (a) Herstellen von rekombinanten Protoplasten von einer ersten Pflanzenspezies, welche eine exogene Nukleinsäure enthalten; (b) Erzeugen von Chromosomenfragmenten von Chromosomen, die in den rekombinanten Protoplasten enthalten sind; (c) Fusionieren der rekombinanten Protoplasten von (b) mit Protoplasten einer zweiten Pflanzenspezies, um fusionierte Protoplasten zu erzeugen, wobei die erste und die zweite Pflanzenspezies gleich oder unterschiedlich sein können; (d) Identifizieren von fusionierten Protoplasten von (c) oder von Zellen, die von den fusionierten Protoplasten von (c) abgeleitet sind, die Chromosomenfragmente enthalten, welche normale pflanzenchromosomale Eigenschaften zeigen; und (e) Regenerieren einer vollständigen Pflanze aus den Protoplasten oder Zellen, die in (d) identifiziert werden, die die Chromosomenfragmente, welche normale pflanzenchromosomale Eigenschaften zeigen, enthalten. Von den transgenen Pflanzen abgeleitetes Saatgut wird ebenfalls bereitgestellt.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0013] Fig. 1 ist eine schematische Darstellung der in vivo-Erzeugung von künstlichen Pflanzenchromosomen gemäß der Erfindung;

[0014] Fig. 2 ist eine Photographie, welche Metaphase-Chromosome eines „gamma"-Hybrids zwischen Nicotiana plumbaginifolia und Atropa belladonna veranschaulicht, wobei (N) Nicotiana-Chromosome veranschaulicht; (A) für Atropa-Chromosome steht; (m) für Minichromosome, die durch „gamma"-Behandlung von Atropa-Protoplasten erzeugt werden, steht; und (r) für ein rekonstruiertes Chromosom steht;

[0015] Fig. 3 ist eine Plasmid-Karte des Plasmids pYAC-GN; und

[0016] Fig. 4A und Fig. 4B sind Plasmid-Karten von pIC461 und pIC462.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0017] Die Erfindung betrifft die Herstellung von künstlichen Chromosomen und die Herstellung von Zelllinien, die funktionelle künstliche Chromosomen enthalten. Auch bereitgestellt werden Verfahren zum

Einführen von DNA in das künstliche Chromosom durch zielgerichtete Integration und Abgabe des künstlichen Chromosoms in Empfängerzellen. Zellen, die das künstliche Chromosom beherbergen können und die bei der Manipulation des künstlichen Chromosoms verwendet werden können, umfassen Hefe und Zellen aus monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen und die Zellkulturen und regenerierten Pflanzen aus jenen Zellen.

[0018] Das Telomer ist ein DNA-Abschnitt an den Enden von Chromosomen, die für die vollständige Replikation der Chromosomenenden benötigt werden. Ein eukaryotisches Chromosom würde nach jeder Replikationsrunde kürzer werden, außer in Gegenwart des Telomers an jedem Ende. Das Telomer weist eine charakteristische DNA-Sequenz auf, die unterschiedlich von der Hauptmenge des Chromosoms repliziert wird. Das Telomer dient als Primer für die Vervollständigung des Folgestrangs, wenn das Chromosom repliziert.

[0019] Die Isolierung des ersten eukaryotischen Telomers erfolgte in 1998 aus Arabidopsis. Untersuchungen der Arabidopsis-Telomere zeigten, dass die Struktur dieser DNA sehr ähnlich zu jener ist, die in niederen Eukaryoten beobachtet wird. Die Telomerstruktur scheint zwischen den Angiospermen gut konserviert zu sein. Die Telomere der monokotyledonen Pflanze Mais unterscheiden sich in der Größe und kreuzhybridisieren mit der Telomersequenz von Arabidopsis. Die Konservierung der Telomerstruktur und -sequenz wird auch im Tierreich festgestellt.

[0020] Das Zentromer wird für die akkurate Segregation der Schwesterchromatide nach der Replikation benötigt. Das Zentromer besteht aus einer Sequenz, die von dem Rest des Chromosoms verschieden ist. Kinetochore, die sich an dem Zentromer bilden, heften sich während Mitose und Meiose an die Spindel an und sind für die Trennung der Chromosomen verantwortlich. Zentromere bestehen typischerweise aus großen Anordnungen von in Tandem-Anordnung wiederholten DNA-Familien. Siehe Clarke, Curr. Opin. Gen. Dev. 8: 212–218 (1998) und Pidoux et al., Curr. Opin. Cell Biol. 12: 308–319 (2000).

[0021] Die DNA-Fragmente, welche die Funktion von autonom replizierenden Sequenzen (ARS) verleihen, sind aus vielen Pflanzenspezies isoliert und charakterisiert worden. Siehe Berlani et al., Plant Mol. Biol., 11: 161–162 (1988); Hernandes et al., Plant Mol. Biol., 10: 413–422 (1988); Berlani et al., Plant Mol. Biol., 11: 173–182 (1988); und Eckdahl et al., Plant Mol. Biol., 12: 507–516 (1989). ARS-Elemente aus Genomen von höheren Pflanzen haben strukturelle und Sequenzmerkmale gemein mit ARS-Elementen aus Hefe und höheren Tieren (Eckdahl et al., Plant Mol. Biol., 12: 507–516 (1989)). Die pflanzlichen ARS-Elemente sind in der Lage, Plasmiden in Saccharomyces cerevisiae die Eigenschaft autonomer Replikation zu verleihen. Eine Untersuchung von nuklären DNA-Sequenzen aus Mais, welche in der Lage sind, die autonome Replikation von Plasmiden in Hefe zu fördern, zeigte, dass sie zwei Familien von hochgradig wiederholten Sequenzen innerhalb des Maisgenoms darstellen. Jene Sequenzen haben charakteristische Genom-Hybridisierungsmuster. Es gab typischerweise nur eine Kopie einer ARS-homologen Sequenz auf jeden 12–15 kb von genomischem Fragment (Berlani et al., Plant Mol. Biol., 11: 161–162 (1988)).

[0022] Gemäß einer Ausführungsform der vorliegend offenbarten Erfindung wird ein künstliches Pflanzenchromosom (PAC) hergestellt, indem zuerst die exogene DNA, z.B. ein oder mehrere Gen(e) von Interesse, einschließlich oder kombiniert mit einem selektierbaren Markergen, in die gewünschte Pflanzenspezies (z.B. Mais) eingeführt wird bzw. werden. Die Auswahl des Vektors für eine Verwendung wird von der bevorzugten Transformationstechnik und der Zielspezies für die Transformation abhängen. Für bestimmte Zielspezies können unterschiedliche Antibiotika- oder Herbizidselektionsmarker bevorzugt sein. Selektionsmarker, die routinemäßig bei Transformationen verwendet werden, umfassen das nptII-Gen, welches Resistenz gegen Kanamycin verleiht (Messing et al., Gene 19: 259–268 (1982); Bevan et al., Nature 304: 184–187 (1983)), das bar-Gen, welches Resistenz gegen das Herbizid Phosphinothricin verleiht (White et al., Nucl. Acids Res. 18: 1062 (1990); Spencer et al., Theor. Appl. Genet. 79: 625–631 (1990)); das hph-Gen, welches Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin verleiht (Blochinger et al., Mol. Cell Biol. 4: 2929–2931)), und das dhfr-Gen, welches Resistenz gegen Methotrexat verleiht. Für eine Agrobacterium-Transformation geeignete Vektoren tragen typischerweise wenigstens eine T-DNA-Randsequenz. Diese umfassen Vektoren, wie pBIN19 und pCIB200 (EP 0 332 104).

[0023] Es werden dann stabile transformierte Zelllinien selektiert, die die exogene oder nicht-native Nukleinsäure exprimieren. Die Zellen können entweder aus einer vollständigen regenerierten Pflanze nach Transformation und Selektion stammen oder die Zellen können ausgehend von einer Suspensionskultur nach Transformation und Selektion erhalten werden. Verfahren zum Transformieren von Pflanzenzellen oder Protoplasten, um exogene DNA in das Pflanzenchromosom zu integrieren, können gemäß Standardprozeduren ausgeführt werden. Die Wahl einer speziellen Technik wird primär davon abhängen, ob die Pflanze eine monokotyledone oder dikotyledone Pflanze ist.

[0024] Transformationstechniken für Dikotyledone sind in diesem Fachbereich wohlbekannt und umfassen auf Agrobacterium basierende Techniken und

Techniken, die keine Agrobacterium erfordern. Nicht-Agrobacterium-Techniken umfassen die Aufnahme von exogenem genetischem Material direkt durch Protoplasten oder Zellen. Diese Techniken umfassen eine PEG- oder durch Elektroporation vermittelte Aufnahme, eine Teilchenbombardement-vermittelte Abgabe und Mikroinjektion. Beispiele von diesen Techniken werden in Paszkowski et al., EMBO J., 3: 2717–2722 (1984); Potrykus et al., Mol. Gen. Genet. 199: 169–177 (1985), Reich et al., Biotechnology 4: 1001–1004 (1986) und Klein et al., Nature, 327: 70–73 (1987) beschrieben. In jedem Falle werden die transformierten Zellen unter Verwendung von Standardtechniken zu vollständigen Pflanzen regeneriert.

[0025] Bevorzugte Transformationstechniken für Monokotyledone umfassen einen direkten Gentransfer in Protoplasten unter Verwendung von PEG oder Elektroporationstechniken und Teilchenbombardement in Kallusgewebe. Die Transformation kann mit einer einzelnen DNA-Spezies oder einer Mehrzahl von DNA-Spezies (d.h. Cotransformation) unternommen werden und diese beiden Techniken sind geeignet für eine Verwendung im Rahmen dieser Erfindung. Eine Cotransformation kann den Vorteil haben, dass komplexe Vektorkonstruktion vermieden und transgene Pflanzen mit nicht-gekoppelten Loci für das Gen von Interesse und den selektierbaren Marker erzeugt werden, was die Entfernung des selektierbaren Markers in nachfolgenden Generationen ermöglicht, sollte dies als wünschenswert angesehen werden. Ein Nachteil der Verwendung einer Cotransformation ist jedoch die weniger als 100%-ige Häufigkeit, mit welcher separate DNA-Spezies in das Genom integriert werden (Schocher et al., Biotechnology 4: 1093–1096 (1986)).

[0026] Erzeugung und Gewinnung (Rescue) von Minichromosomen Von den transformierten Zellen werden gemäß Standardtechniken Protoplasten abgeleitet. In einer bevorzugten Ausführungsform werden Fragmente der Pflanzenchromosome (auch als „Minichromosome" bezeichnet) durch Bestrahlen der Protoplasten hergestellt. Die Bestrahlung macht die Protoplasten nicht-lebensfähig. Hohe Dosen von Gammastrahlung (z.B. 1000 Gy aus einer Cobalt-60-Quelle) sind besonders geeignet. Es gibt andere Methoden zum Fragmentieren von chromosomaler DNA. Beispielsweise können die Protoplasten oder Zellen behandelt oder anderswie mit einem chemischen Mittel in Kontakt gebracht werden. Beispiele von solchen Mitteln umfassen Calicheamicin, Esperamicin, Dynemicin oder Neocarzinostatin. Es wird angenommen, dass diese Mittel eine Chromosomenspaltung über vorübergehende Di-Radikal-Zwischenstufen vermitteln. Siehe Lee et al., J. Antibiot. 42: 1970 (1989); Lee et al., J. Am. Chem. Soc. 114: 985 (1992); und Golik et al., J. Am. Chem. Soc. 109: 3461 (1987).

[0027] Die behandelten Protoplasten werden mit nicht-transformierten oder normalen (z.B. ungeschädigten) Protoplasten, die von Zellen der gleichen Pflanzenspezies oder einer unterschiedlichen, aber verwandten (d.h. die gleiche Familie von) Pflanzenspezies abgeleitet worden sind, gemäß Standardtechniken fusioniert. Der Zweck einer Fusionierung der behandelten Protoplasten mit nicht-transformierten Protoplasten besteht darin, die transformierten Protoplasten von den Auswirkungen der Chromosomenunterbrechung, hervorgerufen z.B durch Bestrahlung oder chemische Behandlung, wiederzubeleben.

[0028] Die fusionierten Protoplasten werden auf selektiven Medien kultiviert, um zu ermöglichen, dass sich vollständige Pflanzenzellen bilden, und Pflanzenzellen zu identifizieren, die das bzw. die Gen(e) von Interesse enthalten und exprimieren. Diese Zellen werden durch eine jegliche geeignete Methode (FISH, GISH, PFGE, Southern-Blot u.s.w.) gescreent, um Linien zu identifizieren, die das Gen von Interesse auf einem Minichromosom, das ansonsten normale chromosomale Aktivitäten zeigt, aufweisen. Mit „normale chromosomale Aktivitäten" ist gemeint, dass die Mikrochromosomen, das künstliche Chromosom oder die Chromosomenfragmente ein Zentromer, Telomer- und ARS-Sequenzen enthalten und durch normale zelluläre Ereignisse, wie Meiose und Mitose, hindurch stabil sind. D.h., sie sind zu unabhängiger Replikation und Transmission durch nachfolgende Zellteilungen hindurch in der Lage.

[0029] Nach dem Analysieren der Stabilität des gewünschten Mikrochromosoms kann es als ein künstliches Chromosom verwendet werden. Diese Zelllinie oder Pflanze kann erneut behandelt werden, wie oben beschrieben, um sogar noch kleinere Mikrochromosomen oder PACs zu selektieren. Die künstlichen Pflanzenchromosome können leicht von einer Pflanzenspezies zu einer anderen bewegt werden durch verschiedene Mittel oder Maßnahmen, einschließlich Verfahren, die auf der Bildung von instabilen Hybriden basieren.

[0030] In einer mehr bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung werden die anfänglichen Transformanten durch geeignete Mittel oder Maßnahmen (z.B. FISH, RAPD, PFGE und Kopplungsanalyse) gescreent, um Zelllinien zu identifizieren, bei welchen sich das oder die Gen(e) von Interesse nahe der Zentromerregion eines Chromosoms befindet bzw. befinden. Diese bevorzugte Ausführungsform bietet nicht nur eine höhere Wahrscheinlichkeit, Mikrochromosomen zu gewinnen, die das oder die gewünschte(n) Gen(e) enthalten, sondern führt zu der Selektion der kürzesten Fragmente, die die exogene DNA enthalten und normale chromosomale Aktivitäten zeigen. Im Allgemeinen liegt die Größe der Minichromosomen im Bereich von ungefähr 3 bis ungefähr 4 Mb.p.

[0031] Chromosomenfragmente, die normale chromosomale Aktivität zeigen und die exogene DNA enthalten, können aus den Protoplasten isoliert und dann auf genetischer Ebene weiter manipuliert werden, um zusätzliches exogenes DNA-Material von Interesse einzubauen, und dann in eine Pflanze von Interesse durch Transformation eingeführt werden. Die isolierten PACs können in die ausgewählte Pflanzenspezies gemäß Standardtechniken, wie Elektroporation oder Protoplasten- oder PEG-vermittelte Transformation, eingeführt werden. In anderen Ausführungsformen werden die Fragmente jedoch nicht isoliert; stattdessen werden sie von Pflanzenzelle zu Pflanzenzelle durch aufeinanderfolgende Fusion mit Protoplasten der ausgewählten Pflanzenspezies bewegt. In diesen Ausführungsformen werden die Pflanzenspezies, die die Chromosomenfragmente enthält, (der „Donor" oder „Spender") und die ausgewählte Pflanzenspezies (der „Empfänger") so ausgewählt, dass nach dem Kreuzen instabile Nachkommenschaft erzeugt wird oder diese Segregationspräferenzen oder ein „Sorting out" zeigen. Geeignete Pflanzenpaare umfassen den Donor Tripsacum und als Empfänger Mais, Weizen, Gerste oder Hafer. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist der Donor Orychophragmus und der Empfänger ist eine Crucifere, wie Canola. In anderen bevorzugten Ausführungsformen sind Donor/Empfänger-Paare, wie folgt: Glycine tomentella/Sojabohne; Solanum phreja/Kartoffel; Mais/Weizen; Mais/Gerste; Mais/Hafer; Pennisetum/Weizen; Pennisetum/Gerste; Hordeum bulbosum/Gerste; Hordeum bulbosum/Weizen; Nicotiana digluta/Nicotiana tabacum und Oryza minuta/Reis. Das Kreuzen des Donors mit der Empfängerpflanze ist eine leistungsfähige Technik, vorausgesetzt, dass eine fertile Pflanze aus einer Gewebekultur, die die PACs trägt, regeneriert werden kann. Die Bewegung der PACs von einer Pflanzenzelle zu einer Hefezelle erfolgt, indem der Pflanzenprotoplast mit einem Hefe-Sphäroplasten fusioniert wird.

[0032] In einer anderen Ausführungsform wird eine sexuelle Kreuzung zwischen zwei Pflanzen nicht nur verwendet, um Chromosomenfragmente zu gewinnen, sondern ebenso für deren nachfolgende Bewegung zwischen unterschiedlichen Organismen. In dieser Ausführungsform werden transformierte Pflanzen erzeugt, wie beschrieben. Anstatt Protoplasten zu behandeln, werden vollständige transgene Pflanzen oder Pollen aus einer vollständigen transgenen Pflanze mit einem Mittel, wie Bestrahlung, behandelt, um eine Chromosomenfragmentierung zu induzieren. Ein solcher behandelter Pollen wird dann verwendet, um eine zweite Pflanze zu bestäuben. Es ist gezeigt worden (Pandey, Nature 256: 310–313 (1975)), dass Kreuzungen zwischen bestrahlten und normalen Pflanzen vorgenommen werden und zu einem Transfer von Marker-Merkmalen aus den bestrahlten Organismen führen können; die Natur einer solchen Transgenose ist niemals ermittelt worden. Die Nachkommenschaft aus solchen Kreuzungen wird analysiert und Chromosomenfragmente, die als Chromosomen funktionieren, werden auf die gleiche Weise wie Chromosomen, die durch eine Protoplastenfusion rekonstruiert worden sind, identifiziert.

[0033] Die exogene Nukleinsäure variiert in großem Umfang. Sie umfasst beispielsweise eine jegliche DNA, die in dem nativen Pflanzengenom oder in der gewünschten Kopienzahl nicht vorhanden ist und die ein Protein kodiert, dessen Expression in Pflanzen aus irgendeinem Gesichtspunkt wertvoll sein würde. Die DNAs und Proteine fallen unter die breiten Kategorien von Nutzpflanzenschutz, Nutzpflanzenverbesserung, Herstellung von Spezialitätenverbindungen, einschließlich spezieller Chemikalien, nutrazeutischer Verbindungen und anderer Produkte, die mit Nahrungsmittelqualität in Verbindung stehen, wie modifizierte Stärke, Öle und Proteinzusammensetzungen, die insgesamt die Expression eines koordinierten Satzes von Genen und folglich ein spezialisiertes Transformationssystem erfordern, um zu bewirken, dass die Pflanze das Merkmal von Interesse zeigt. Ein Beispiel ist der Isoprenoid-Biosyntheseweg, der durch Pflanzen nicht reguliert wird. Alle Gene, die an der Mevalonat-Biosynthese beteiligt sind – HMG-CoA-Synthase, HMG-CoA-Reduktase, Mevalonatkinase, Phosphomevalonatkinase, Mevalonatpyrophosphatcarboxylase und Isopentenylpyrophosphatisomerase – sind wohlbekannt. Andere Beispiele sind die an der Aminosäuresynthese beteiligten Gene. Die exogenen Gene können nützlich sein, um die Zufuhr- oder Input-Erfordernisse einer Pflanze, wie ihre Reaktion auf die Umwelt, ihre Fähigkeit, sich selbst vor Schädlingen zu schützen, Schutz vor xenobiotischen Mitteln, die andere Merkmale, wie die Gesamtausbeute, verändern, Produktion von aus Ernährungssicht ausgewogenem Protein, Stärke besserer Qualität, hohe Qualität oder Menge von Ölen oder Vitamin-Konzentrationen zu modifizieren. Die Gene können es auch den Pflanzen ermöglichen, Funktionen, die sie normalerweise nicht ausführen, auszuführen, wie pharmazeutische Proteine, Antigene und kleine Moleküle herzustellen.

[0034] Zusätzlich zu dem Gen oder den Genen, von denen beabsichtigt wird, dass sie einen Empfänger des künstlichen Pflanzenchromosoms mit einem oder mehreren Merkmalen von Interesse ausstatten, ist es bevorzugt, dass die exogene Nukleinsäure derart organisiert ist, dass sie mehrere Charakteristiken, z.B. Rekombinationsstellen für die Einführung von neuen Genen, Bestandteile eines künstlichen Hefechromosoms (YAC), wie Telomersequenzen und eine autonome replizierende Sequenz, und vorzugsweise diese Elemente in Kombination mit einem Zentromer, welche dem PAC Hefe-Pflanzen-Shuttle-Charakteristiken verleihen, Restriktionsenzymstellen von geringer Häufigkeit für eine nachfolgende Klonierung und andere Eigenschaften, die eine nachfolgende Mani-

pulation in vitro vereinfachen, umfasst. Das Vorhandensein der YAC-Sequenzen erlaubt eine weitere Selektion auf das Vorhandensein von künstlichen Chromosomen und ein Ausführen von genetischen Manipulationen mit diesen. Die künstlichen Chromosomen können zu Hefe transferiert werden für eine Umgestaltung, d.h. Ausstatten mit den Sequenzen von Interesse, einschließlich jenen für eine ortsspezifische homologe Rekombination, und in die Pflanzenzellen zurück transferiert werden. Siehe U.S.-Patente 5,270,201; 5,288,625; 5,721,118 und 5,712,134. Hefe weist ein effizientes homologes Rekombinationssystem auf, das die DNA-Manipulation innerhalb von Hefezellen vereinfacht (Spencer et al., in: Methods: a companion to Methods Enzymol. 5: 161–175 (1993); Hieter et al., in: Genome analysis: genetic and physical mapping, Hrsg. Davies, Tilghman. Cold Spring Harbor: CSH Laboratory Press, 1: 83–120 (1990)). Gegenwärtig sind so wenig wie 30 bp einer homologen Sequenz an jedem Ende eines DNA-Fragments ausreichend, um das Fragment in ein linearisiertes Plasmid in Hefe zu integrieren (Hua et al., Plasmid, 28: 91–96 (1997)). Die Entwicklung eines künstlichen Hefechromosoms (YAC) macht die Manipulation mit fremder DNA sogar noch bequemer. YACs können mehr als 2 Mb an DNA-Inserts tolerieren (Burke et al., Science, 236: 806–812 (1987)). Pflanzliche Minichromosomen, die selektierbare Pflanzen-Marker und YAC-Sequenzen tragen, könnten als ein Shuttle-Vektor, der für eine genetische Manipulation aus den Pflanzenzellen in Hefe transferiert und dann in die Pflanzenzelle zurück transferiert werden kann, dienen. Durch Verwendung eines homologen Rekombinationssystems kann dieser Shuttle-Vektor mit jeglichen Genen von Interesse, Sequenzen, die durch ortsspezifische Rekombinasen (FLP, R, Cre) erkannt werden, oder zusätzlichen selektierbaren Markern ausgestattet werden. Alternativ können große Fragmente von pflanzlichen Minichromosomen deletiert oder durch andere Sequenzen ersetzt werden (Spencer et al., in: Methods: a companion to Meth. Enzymol. 5: 161–175 (1993)). Es ermöglicht auch die präparative Isolierung von pflanzlichen Minichromosomen für weitere Manipulationen, wie eine Subklonierung und Sequenzierung, oder eine erneute Einführung in die Pflanzenzellen mit der Hilfe von Mikroinjektion, Lipofektion oder Elektroporation. Diese Transformationsmethoden könnten jedoch eine technische Barriere für das Gewinnen von ausreichenden Mengen von intakter DNA aufweisen. Über die direkte Einführung von YAC-DNA durch Zellfusion ist für Säugetierzellen (Pavan et al., Mol. Cell Biol. 10: 4163–4169 (1990); Pachnis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 5109–5113, (1990)) wie auch für Pflanzenprotoplasten (Hatsuyama et al., Plant Cell Physiol. 35: 93–98 (1994) berichtet worden. Das letztgenannte Verfahren erlaubt das Transferieren der DNA von Interesse aus Hefe in eine Pflanzenzelle mittels Hefe-Sphäroplasten – Pflanzen-Protoplasten-Fusion, wodurch eine DNA-Fragmentierung vermieden wird. Der gleiche Ansatz kann für den Transfer von Minichromosomen aus Pflanzenzellen in die Hefe verwendet werden. So zeigen die Minichromosomen, die alle für eine unabhängige Aufrechterhaltung in Pflanzen- und Hefezellen erforderlichen Elemente tragen, alle Merkmale eines Pflanzen-Hefe-Shuttle-Vektors.

[0035] Ortsspezifische Rekombinasen aus Bakteriophagen und Hefen werden weithin als Werkzeuge (Tools) für die Manipulation von DNA sowohl im Teströhrchen als auch in lebenden Organismen verwendet. Bevorzugte Rekombinasen/Rekombinationsstellen-Kombinationen für eine Verwendung im Rahmen der Erfindung sind Cre-Lox, FLP-FRT und R-RS, wobei Cre, FLP und R Rekombinasen aus dem Bakteriophagen P1, Hefe bzw. Zygosaccharomyces rouxii sind, und Lox, FRT und RS die Rekombinationsstellen sind. Andere geeignete Systeme umfassen die attP- und attB-Stellen, die durch die Integrase des ortsspezifischen Rekombinationssystems des Streptomyces-Bakteriophagen phiC31 erkannt werden. Um in Pflanzenzellen funktionsfähig zu sein, erfordern diese Stellen 7–8 Basenpaare (bp) einer Kernsequenz zwischen 12–13 bp invertierten Wiederholungssequenzen; die asymmetrische Kernsequenz bestimmt die Orientierung der Stelle und folglich die Arten von Rekombinationsprodukt. Unabhängig davon, ob Rekombinationsstellen an einem oder innerhalb eines einzelnen DNA-Molekül(s) von Interesse in direkter oder entgegengesetzter Orientierung angeordnet sind oder auf nicht-verknüpften linearen oder zirkulären DNA-Molekülen angeordnet sind, kann die entsprechende Rekombinase den reziproken Austausch katalysieren, um ein Deletions-, Inversions-, Translokations- oder Cointegrationsereignis zu erzeugen. Siehe Bollag et al., Ann. Rev. Genet. 23: 199–225 (1989); Kilby et al., Trends Genet., 9: 413–421 (1993); und Ow, Curr. Opinion Biotech. 7: 181–186 (1996). Beispiele von Restriktionsstellen geringer Häufigkeit z.B. für selten schneidende Restriktionsenzyme und Nukleasen, umfassen die Intron-kodierte Hefe-Endonuklease I-SceI (Choulika et al., Mol. Cell Biol. 15: 1968–1973 (1995)), Ho-Nuklease von S. cerevisiae, Not1 (ein 8 bp-Restriktionsenzym) und 6 bp-Restriktionsenzyme mit einer geringen Anzahl von Erkennungsstellen in Pflanzengenomen, z.B. Sal1 und Cla1.

[0036] Eine andere Ausführungsform der Erfindung ist auf Kulturen von Pflanzenzellen gerichtet, die Chromosomenfragmente, die die exogene DNA enthalten und die normale chromosomale Aktivitäten zeigen, enthalten. Ein anderer Aspekt dieser Ausführungsform ist auf transgene Pflanzen gerichtet, die ausgehend von den vorerwähnten Kulturen regeneriert oder von diesen abgeleitet worden sind. Pflanzen, die gemäß den offenbarten Verfahren erzeugt worden sind, unterscheiden sich genetisch von transgenen Pflanzen, die über bekannte Verfahren er-

zeugt worden sind. Die transgenen Pflanzen der vorliegenden Erfindung enthalten die Transgene an einem einzelnen Genort und ermöglichen, dass die Transgene in einem Züchtungsprogramm zusammen als ein einzelner Genort transferiert werden. Bekannte Verfahren führen andererseits zu der zufälligen Integration des Transgens in das Pflanzengenom.

[0037] Die Verfahren der Erfindung können an einer großen Vielzahl von Pflanzen praktisch ausgeführt werden. Diese umfassen: Mais, Tomate, Rasengraspflanzen, Spargel, Papaya, Sonnenblume, Roggen, Bohnen, Kartoffel, Reis, Erdnuss, Gerste, Malz, Weizen, Alfalfa, Sojabohne, Hafer, Aubergine, Kürbis, Zwiebel, Brokkoli, Zuckerrohr, Zuckerrübe, Rüben, Äpfel, Orangen, Grapefruit, Birne, Pflaume, Pfirsich, Ananas, Traube, Rose, Nelke, Tulpe, Douglastanne, Zeder, Weymouthskiefer, gemeine Kiefer („scotch pine"), Fichte, Erbsen, Baumwolle, Flachs, Kaffee und Mitglieder der Brassica-Familie, wie Canola und Rübsamen.

[0038] Obwohl bislang im Kontext von Pflanzenzellen beschrieben, ist das Verfahren der Erfindung auch auf tierische Zellen und künstliche Tierchromosomen anwendbar. Diese Ausführungsform umfasst das Einführen einer exogenen Nukleinsäure, z.B. DNA, in tierische Zellen, um eine transformierte tierische Zelle zu erzeugen, das Behandeln der transformierten tierischen Zellen z.B. durch Bestrahlung oder mit chemischen Mitteln, um Chromosomenfragmente zu erzeugen; das Fusionieren der behandelten tierischen Zellen mit nicht-transformierten oder ungeschädigten tierischen Zellen, die die gleichen wie die transformierten Zellen oder von diesen verschieden sind (vorzugsweise die gleichen oder von einem eng verwandten Tier, wie beispielsweise aus der gleichen Familie); und das Identifizieren von Zellen, die von den fusionierten Zellen abgeleitet sind, die Chromosomenfragmente, die normale tierische chromosomale Aktivitäten zeigen, enthalten und in welchen die exogene Nukleinsäure exprimiert wird.

[0039] Die Erfindung wird weiter durch Bezugnahme auf die detaillierten Beispiele beschrieben. Diese Beispiele werden bereitgestellt nur zu Zwecken der Veranschaulichung und sollen diese nicht einschränken, soweit nicht anders angegeben.

BEISPIELE

[0040] Dieser Abschnitt enthält drei Beispiele. Beispiel 1 beschreibt Experimente, die ausgeführt wurden, um die Herstellung von stabilen Mikrochromosomen nach Bestrahlung, Fusion und Pflanzenregeneration zu demonstrieren. Beispiel 2 demonstriert die Herstellung von stabilen künstlichen Chromosomen, die in der Lage sind, den Zellen, in welchen sie aufrechterhalten werden, einen selektiven Vorteil zu verleihen und die künstliche Hefechromosomen enthalten, um dem künstlichen Pflanzenchromosom Shuttle-Eigenschaften zu verleihen. Beispiel 3 ist ein Verfahren zum Sichtbarmachen der Lage der eingeführten exogenen DNA in einer Pflanzenzelle und für die Sichtbarmachung von Mikrochromosomen.

Beispiel 1: Beweis für die Erzeugung von stabilen Chromosomenfragmenten

[0041] Populationen von asymmetrischen Hybriden werden hergestellt durch Fusion mit einem mittels Strahlung inaktivierten Donor. Die Manipulation der eingeführten genetischen Variation könnte zu einer schnelleren Introgression eines gewünschten Merkmals führen. Dementsprechend könnte diese Technik in Züchtungsprogrammen angewendet werden. Bei den asymmetrischen nukleären Hybriden, die zwischen entfernten und eng verwandten Spezies erzeugt worden sind, waren die resultierenden Pflanzen männlich-steril, sogar obwohl sie nur einige wenige Chromosomen aus dem Donor-Partner zu enthalten schienen, wie in Famelaer et al., Theor. Appl. Genet. 79: 513–520 (1990) gezeigt wurde. Das in **Fig. 1** gezeigte Schema zeigt die grundlegende Strategie, welche für die Herstellung von Minichromosomen in Pflanzenzellen angewendet worden ist.

Protoplastenisolierung, Fusion, Selektion und Regeneration

[0042] Schösslingskulturen der NR-defizienten Mutante Nia 26 von N. plumbaginifolia (2n 20, Reversionsfrequenz 4.04 10-7 (Dirks et al., Mol. Gen. Genet. 179: 283–288 (1986)) wurden kultiviert, wie von Negrutiu et al., Theor. Appl. Genet. 66: 341–347 (1983) beschrieben. Schösslingskulturen von N. sylvestris, V-42 (2n = 24, Chlorophyll-defiziente Mutante) wurden auf R'SA-Medium (Negrutiu et al., Theor. Appl. Genet. 66: 341–347 (1983)) kultiviert. Mesophyll-Protoplasten wurden ausgehend von beiden Ausgangspflanzen gemäß Negrutiu, Z. Pflanzenphysiol. 100: 373–376 (1981) isoliert. Donor-Protoplasten wurden in einer Gamma cell 200 (Co60-Quelle, Dosisrate: 0,048 J kg-1 s-1) mit unterschiedlichen Dosen bestrahlt und mit Empfängerzellen fusioniert gemäß Kao, in: Wetter, LR, Constabel F (Hrsg.) Plant Tissue Culture Methods, NRCC 19876: 49–57, (1982). Kultur- und Selektionsbedingungen von Protoplasten und Fusionsprodukten wurden realisiert gemäß Dirks et al., Mol. Gen. Genet. 179: 283–288 (1986). Zellkolonien wurden auf RPO.25- oder RP1-Medium (Installe et al., J. Plant Physiol. 119: 443–454 (1985)) mit 0,25 mg oder 1 mg/l Zeatin regeneriert. Regenerierte Pflanzen wurden auf R'SA-Medium weiter kultiviert.

Chromosomenanalyse von regenerierten Hybriden

[0043] Die Chromosomenanalyse wurde durch morphologische Unterschiede von Empfänger- und Donor-Metaphasenchromosomen vereinfacht.

[0044] N. plumbaginifolia ist durch telozentrische und N. sylvestris durch meta- oder submetazentrische Chromosomen gekennzeichnet. Regenerierte Pflanzen können in zwei Gruppen eingestuft werden: eine erste Gruppe von 19 Pflanzen aus 13 unterschiedlichen Zellkolonien mit 43–56 Chromosomen (37–42 Empfänger-Chromosomen) und eine zweite Gruppe (2 Pflanzen aus 2 unabhängigen Zellkolonien) mit 61–67 Chromosomen und einem hexaploiden Satz von Empfänger-Chromosomen. Die durchschnittliche Anzahl von identifizierbaren Donor-Chromosomen beträgt bei 15 unabhängigen regenerierten Pflanzen ungefähr 8,7. Bei allen Pflanzen wurden Donor-Chromosomen-Fragmente, welche aus einer durch Strahlung induzierten Schädigung resultierten, beobachtet.

[0045] Die gesamte Anzahl und der genaue Typ der Chromosomen sind aus mehreren Gründen schwierig zu ermitteln. Erstens können geringfügige Variationen bei den Chromosomenzahlen innerhalb von einer regenerierten Pflanze existieren. Auch kann eine strahlungsbedingte Schädigung von Donor-Chromosomen zu Empfänger-artigen Chromosomen führen; und interspezifische Chromosomen-Austausche können zu umkonstruierten und Deletionen aufweisenden Empfänger-Chromosomen wie auch zu dem Verlust von Chromosomen führen. Schließlich könnten möglicherweise Chromosomen-Translokationen nicht beobachtet werden.

[0046] Fusionsprodukte zwischen entfernten Spezies eliminieren im Allgemeinen spontan eines der Ausgangsgenome, wodurch asymmetrische Hybride erzeugt werden, die zusätzlich zu einem vollständigen Empfängergenom einige wenige Chromosome, die von dem Donor abgeleitet sind, enthalten. Es sind Verfahren zum Transferieren von Teilen des Pflanzengenoms entwickelt worden, da oftmals gewünscht wird, nur eine geringe Anzahl von Merkmalen von dem Donor in den Empfänger einzuführen. Die Donor-Empfänger-Methode, welche auch als „gamma"-Fusion bezeichnet wird, ist die am häufigsten verwendete Technik zum Erzeugen von asymmetrischen somatischen Hybriden. Obwohl die Bestrahlung den Prozess der Chromosomenelimination dirigiert, ist diese nicht die einzige Kontrolle des Verfahrens. Hochgradig asymmetrische Hybride, in denen nur eines oder einige wenige Donor-Chromosomen enthalten sind, sind nur selten beschrieben worden. Diese Beobachtung ist unabhängig von der verwendeten Strahlungsdosis.

Herstellung von Minichromosomen in asymmetrischen „gamma"-Hybriden zwischen Nicotiana und Atropa

[0047] Es wurden eine Nitratreduktase-defiziente Mutante von Nicotiana plumbaginifolia (cnx 20) und Atropa belladonna-Pflanzen für die Experimente verwendet. Protoplasten wurden isoliert, wie von Negrutiu et al., Theor. Appl. Genet. 72: 279–286 (1986), beschrieben. Die Behandlung von Atropa belladonna-Protoplasten mit unterschiedlichen Dosen von Gammastrahlen wurde ausgeführt, wie von Gleba et al., Theor. Appl. Genet. 76: 760–766 (1988), beschrieben. Die Fusionen von Protoplasten wurden ausgeführt, wie von Menczel et al., Genetics, 100: 487–495 (1982) beschrieben. Protoplasten wurden in K3-Medium 2 Wochen kultiviert, verdünnt in MDn-Medium (Negrutiu et al., Theor. Appl. Genet. 66: 341–347 (1983); Negrutiu et al., Theor. Appl. Genet. 72: 279–286 (1986)). Nach 1 Monat wurden sichtbare Kalli auf festes Medium transferiert und regeneriert, wie anderswo beschrieben (Installe et al., J. Plant Physiol. 119: 443–454 (1985)). Äquatorialplatten von Wurzelspitzen wurden für eine Chromosomenanalyse präpariert, wie von Gleba et al., Theor. Appl. Genet. 76: 760–766 (1988) beschrieben. Die Chromosomenanalyse wurde stark vereinfacht, da die Atropa-Metaphasenchromosome ungefähr zweimal kürzer und signifikant dünner als Nicotiana plumbaginifolia-Chromosomen sind (Gleba et al., Theor. Appl. Genet. 76: 760–766 (1988)). Minichromosomen, die signifikant kleiner als intakte Atropa-Chromosomen sind, wurden in allen analysierten Proben detektiert. Die Größe von detektierbaren Minichromosomen war variabel, beginnend mit fast der halben Größe des Ausgangschromosoms bis zu kaum sichtbaren Minichromosomen (Fig. 2). Es ist überaus möglich, dass solche „gamma"-Hybride so kleine Minichromosomen enthalten, dass sie auf der Äquatorialplatte schlicht und einfach unsichtbar sind.

[0048] Die in Beispiel 1 beschriebenen Konstrukte sind für viele unterschiedliche Zwecke geeignet, einschließlich der Gewinnung („rescue") von pflanzlichen Minichromosomen in Hefezellen und der Klonierung von jeglichen Genen von Interesse. Die Gene von Interesse, die in den YAC kloniert werden könnten, würden Gene für Herbizidresistenz, Qualitätsmerkmalsverbesserung, wie Stärkemodifizierung, Ölqualität, Proteinqualität, Trockenheitsbeständigkeit, Kältetoleranz, Schädlingsresistenz und andere in der Landwirtschaft relevante Zufuhr(„Input")- und Ertrags-(„Output")-Merkmale, umfassen, sind aber nicht darauf beschränkt.

[0049] Es kann eine jegliche Anzahl von Verfahren verwendet werden, um die Integrationsstellen des YAC zu identifizieren. Diese Verfahren umfassen RAPD zur Kartierung, Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) und eine Southern-Analyse. Durch Identifizieren von Konstrukten, die sich nahe dem Zentromer inseriert haben, besteht eine höhere Chance, fragmentierte Chromosomen zu gewinnen, welche die Zentromerregion und das Konstrukt von Interesse enthalten.

[0050] Es gibt Hinweise darauf, dass dieses mini-

male „Chromosom" in der Zelle repariert werden kann, so dass es Telomere enthält. Dieses biologisch zusammengefügte künstliche Chromosom könnte durch Transformation von Hefe gewonnen („rescue") und ausgehend davon verwendet werden, um andere Pflanzen der gleichen Spezies erneut zu transformieren.

Beispiel 2: Identifizierung von Kanamycin-resistenten Pflanzen nach Bestrahlung und asymmetrischer Fusion

Isolierung, Fusion und Kultur von Protoplasten

[0051] Mesophyll-Protoplasten wurden ausgehend von 4 bis 6 Wochen alten Pflanzen von N. plumbaginifolia (P2) und Kanamycin-resistenten Petunia hybrida (Transformante VR2828 x V23) isoliert, wie von Negrutiu et al., Theor. Appl. Genet. 72: 279–286 (1986), beschrieben. Vor der Fusion wurden Kanamycin-resistente Petunia-Protoplasten mit Gammastrahlen (100 krad) aus einer Cobalt 60-Quelle bestrahlt. Fusionen wurden ausgeführt, wie von Menczel et al., Genetics 100: 487–495 (1982), beschrieben. Die Protoplasten wurden in K3-Medium weiter kultiviert und nachfolgend in Selektionsmedium (MDn), ergänzt mit 25 mg/l Kanamycinmonosulfat, verdünnt. Nach einem bis zwei Monaten wurden sichtbare Kalli auf festes Selektionsmedium transferiert und nachfolgend regeneriert, wie von Installe et al., J. Plant Physiol. 119: 443–454 (1985), beschrieben. Unter den gleichen Bedingungen wurden Kontrollexperimente ausgeführt.

Zytologische Analyse

[0052] Für eine Chromosomenanalyse wurden Äquatorialplatten unter Verwendung der Protoplasten-Methode, wie von Mouras et al., Caryolgia 31: 117–127 (1978), beschrieben, präpariert. Alternativ wurden Metaphase-Ausbreitungen („Metaphase-Spreads") auch ausgehend von den Wurzelspitzen von regenerierten Pflanzen erhalten, wie von Pijnacker et al., Can. J. Genet. Cytol. 26: 415–419 (1984), beschrieben.

Hybridisolierung

[0053] Eine bis zwei Wochen nach der Fusion von Wildtyp-N. plumbaginifolia(P2)-Protoplasten mit bestrahlten (100 krad) Kanamycin-resistenten Petunia hybrida(Transformante VR2828 × V23)-Protoplasten wurde Kanamycinmonosulfat in einer Konzentration von 25 mg/l zu dem Kulturmedium hinzugegeben. Nach einer weiteren Kultivierung von einem bis zwei Monaten wurden grüne resistente Kalli mit einer Frequenz von ungefähr 10-4 erhalten. Diese Transformationsfrequenz liegt in dem Bereich von „gamma"-Fusionsexperimenten. Insgesamt wurden 86 stabile Kanamycin-resistente Kalli erhalten und 24 (28%) konnten leicht zu Pflanzen regeneriert werden, die dem Empfänger-Partner N. plumbaginifolia ähnelten. Darüber hinaus regenerierten organogene hybride Kalli zahlreiche Schösslinge, die auf zytologischer, molekularer und genetischer Ebene analysiert wurden. Wie erwartet, führten Kontrollexperimente überhaupt nicht zu der Erzeugung von resistenten Kolonien auf dem Selektionsmedium.

[0054] Durch Karyotyp-Analyse sind insgesamt 14 Linien analysiert worden. In den meisten der Linien wurden auf der diploiden oder tetraploiden Ebene nur Nicotiana-Chromosomen beobachtet. Jedoch konnten in einer diploiden Linie und vier Linien, die nahezu tetraploid waren, einige wenige (2–3) Chromosomenfragmente festgestellt werden.

[0055] Durch die Behandlung von Pflanzenzellen mit letalen Bestrahlungsdosen und nachfolgende Fusionsexperimente sind verschiedene asymmetrische nukleäre hybride Klone erzeugt worden. Ausgehend von diesen Ergebnissen scheint es, dass eine Bestrahlung verwendet werden kann, um den Prozess der Chromosomen-Eliminierung teilweise zu dirigieren, und dass die Eliminierung nicht nur auf die mutagene Wirkung der Bestrahlung zurückzuführen ist. Dieses Verfahren führt zu vollständig fertilen hybriden Pflanzen. Die Fähigkeit, hybride Pflanzen zu erhalten, die Kanamycin-resistent waren, war abhängig von dem Vorhandensein des Kanamycin-Gens in dem bestrahlten Donor. Die gesamten regenerierten Pflanzen ähnelten dem Empfänger-Partner. In einigen Linien wurde das Vorhandensein von einigen wenigen Chromosomenfragmenten nachgewiesen, was wahrscheinlich durch die Bestrahlung der Protoplasten erzeugt wird.

Vektoren für die Minichromosom-Markierung („tagging")

[0056] Um wie oben beschrieben hergestellte pflanzliche Minichromosomen zu markieren („tagging") und zu gewinnen („rescue"), wurden zwei unterschiedliche Vektorsysteme verwendet.

[0057] Der erste Vektor pYAC-GN ist in **Fig. 3** gezeigt. Er wurde ausgehend von pYAC-4 durch Insertion von zwei Genen: p35S-APH(3')III-NOS3' und p35S-GUS-NOS3' in Sal1- bzw. Cla1-Stellen erzeugt. Transformierte Pflanzen können hinsichtlich Kanamycinresistenz wie auch hinsichtlich GUS-Aktivität selektiert werden. Ein Polylinker, welcher Stellen enthielt, bei welchen bezogen auf pflanzliche DNA selten ein Schnitt stattfindet, wurde in die EcoRI-Stelle des SUP4-Gens inseriert. Dieser Polylinker kann für eine weitere Modifizierung von pYAC-GN verwendet werden, indem beispielsweise Rekombinationsstellen, die durch ortsspezifische Rekombinasen erkannt werden, inseriert werden, wodurch eine Integration von einem jeglichen oder jeglichen Gen(en)

von Interesse in pflanzliche Minichromosomen, welche YAC-GN enthalten, ermöglicht wird. Der Rest der Sequenzen in dem Konstrukt ist von pYAC 4-Ursprung und kann verwendet werden, um pflanzliche Minichromosomen in Hefezellen zu gewinnen.

[0058] Zwei andere Vektoren, pIC461 und pIC462 (**Fig.** 4), wurden hergestellt, wie nachfolgend beschrieben. Die Expressionskassette p35S:GUS:OCS3' wurde in die ClaI-Stelle von pYAC-4 kloniert. Das resultierende Plasmid wurde als BamHI-Fragment in pBIN19 inseriert, wodurch pIC461 oder pIC462 abhängig von der Orientierung des Inserts erzeugt wurde. Dieser Vektor ermöglicht eine Agrobacterium-vermittelte Transformation von Pflanzenzellen aufgrund des Vorhandenseins des pNOS-NPTII-NOS3'-Gens innerhalb der T-DNA-Randsequenzen („borders").

Transformation von Nicotiana-Spezies mit von YAC abgeleiteten Konstrukten

[0059] Der Vektor pYAC-GN wurde für eine direkte Transformation von Nicotiana tabacum-Protoplasten unter Verwendung einer PEG-Lösung mit Ca^{2+} und pH 9,8 verwendet. Samen von Nicotiana tabacum cv Wisconsin wurden auf MS-Medium nach Sterilisation mit einer „Disäure" („diacid")-Lösung für 5 min und fünfmaligem Waschen mit sterilem Wasser gekeimt. Für die Protoplastenisolierung wurden drei bis vier Wochen alte Blätter verwendet. Die Protoplasten wurden transformiert, wie von Koop et al., Planta, 199: 193–201 (1996) beschrieben. Blätter wurden auf (zu) Stücken geschnitten und mit der abaxialen Seite nach unten auf die Oberfläche einer mittels Filter sterilisierten Enzymlösung, enthaltend Cellulose Onozuka 0,5%, Macerozim 0,5%, Dricelase 0,25%, Cellulysin 0,25%, 0,5 M Mannitol und $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 110 mg/l, gelegt. Der pH wurde auf 5,7 eingestellt. Nach einer sechzehnstündigen Inkubation bei 27°C im Dunkeln wurden Blattstücke hin- und hergeschubst, so dass sie jegliche Protoplasten freisetzten, die noch nicht durch die Enzymwirkung allein freigesetzt worden waren. Die Protoplasten wurden durch Zentrifugation (100 × g, 5 min) sedimentiert und in 0,5 M Saccharose, 15 mM $CaCl_2$ gewaschen. W5-Lösung wurde auf die Oberfläche aufgetragen, um eine Schädigung der Protoplasten aufgrund eines direkten Kontakts mit der Luft zu verhindern. Nach einer Zentrifugation bei 100 × g für 5 min wurden Protoplasten in ein neues Zentrifugenröhrchen transferiert und in 10 ml TB-Puffer, enthaltend 0,4 M Mannitol, 15 mM $CaCl_2$, pH 5,7, resuspendiert. Die Dichte der Protoplasten wurde auf 5×10^6 Protoplasten/ml eingestellt. Einhundert Mikroliter von dieser Suspension wurden zu einer 6 cm-Petrischale transferiert und die Protoplasten wurden einige Minuten stehen gelassen, um sich abzusetzen. Die DNA-Lösung (25 µl von 50 µg pYAC-GN, gelöst in 18 µl TE, pH 5,6, plus 7 µl Kulturmedium) wurde vorsichtig zu der Suspension hinzugesetzt, durch sanftes Schwenken der Petrischale resuspendiert und schließlich mit 125 µl PEG-Lösung (40% (Gew./Vol.) PEG 4000, 70 mM $Ca(NO_3)_2$, 1,2754 g Mannitol pro 26 ml) gemischt. Nach 7–8 min Inkubation wurde das Kulturmedium bis zu einem Volumen von 125 µl zugesetzt und nach zwei Minuten wurden nach und nach 2,6 ml Kulturmedium zugegeben. Nach zwei Wochen Inkubation wurde Kanamycin zugesetzt, um transformierte Kolonien zu selektieren. Die Agrobacterium-vermittelte Pflanzentransformation wurde mit zwei anderen Vektoren – pIC461 und pIC462 verwendet. Eine Blattscheiben-Transformation von Nicotiana sylvestris- und Nicotiana tabacum-Spezies wurde unter Verwendung eines Standardprotokolls ausgeführt. Blattscheiben wurden mit Agrobacterium tumefaciens EHA 105, welches pIC461 oder pIC462 beherbergte, in mit 1 mg/l BAP und 0,5 mg/l NAA ergänztem MS-Medium cokultiviert. Nach 24 h wurden Blattscheiben auf festes MS-Medium mit 1 mg/l BAP, 0,1 mg/l NAA, 200 mg/l Carbenicillin und 200 mg/l Cefotaxim transferiert. Nach 7 Tagen wurden Explantate auf das gleiche Medium, aber ergänzt mit 25 mg/l Kanamycin, transferiert. Nach 2–3 Wochen wurde die Kanamycin-Konzentration auf 50 mg/l erhöht.

Erzeugung von Minichromosomen durch Bestrahlung von Protoplasten

[0060] Protoplasten von primären Transformanten, welche pYAC-GN oder T-DNA von entweder pIC461 oder pIC462 trugen, wurden für eine Gammabestrahlung verwendet. Dann wurden gammabestrahlte Protoplasten von Nicotiana tabacum mit Protoplasten von der anderen fusioniert. Es war in Parokonny et al., Plant J. 2: 863–874 (1992), darüber berichtet worden, dass in mehreren regenerierten Pflanzen eine Anzahl von stabilen Minichromosomen, welche von dem bestrahlten Ausgangsmaterial stammten, vorhanden war. Der Zweck dieses Experiments bestand dementsprechend darin, die asymmetrische somatische Hybride zu erhalten, welche ein Minichromosom mit loxP-Stelle aufwies. Es wurden zwei Bestrahlungsdosen verwendet – 250 Gy und 500 Gy. Die Protoplasten-Fusionstechnik, die ausgeführt wurde, basierte auf jener von Negrutiu et al., Theor. Appl. Genet. 66: 341–347 (1983). Blätter wurden auf (zu) Stücken geschnitten und mit der abaxialen Seite nach unten auf die Oberfläche einer mittels Filter sterilisierten Enzymlösung, enthaltend Cellulose Onozuka 0,5%, Macerozim 0,5%, Dricelase 0,25%, Cellulysin 0,25%, 0,5 M Mannitol und $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 110 mg/l, 6 mg/l BAP und 2 mg/l NAA, gelegt. Der pH wurde auf 5,7 eingestellt. Nach einer sechzehnstündigen Inkubation bei 27°C im Dunkeln wurden die Protoplasten durch Zentrifugation (100 g, 5 min) pelletiert und in der Lösung aus 0,5 M Saccharose mit 15 mM $CaCl_2$ gewaschen. W5 wurde auf die Oberfläche der Suspension aufgetragen, um die Protoplasten an einem Kontakt mit der Luft zu hindern. Protoplasten wurden

in 10 ml W5 resuspendiert und bestrahlt. Bestrahlte Protoplasten wurden mit nicht-bestrahlten Protoplasten von Nicotiana plumbaginifolia gemischt. Ungefähr 0,5 ml von jener Mischung wurden zu der 6 cm-Petrischale transferiert und man ließ sie sich 20 min absetzen. Es wurde vorsichtig ein gleiches Volumen PEG-Lösung [40% PEG 4000, 70 mM $Ca(NO_3)_2$, 1,2754 g Mannitol pro 26 ml (0,27 M)] zugesetzt. Dann wurden 200 µl W5 zugegeben, 15–30 min inkubiert und mit weiteren 2 ml W5 gemischt. Nach 20 min Inkubation wurde W5 einmal gewechselt und schließlich durch 3 ml Kulturmedium ersetzt. Nach zwei bis drei Wochen Inkubation wurde Kanamycinsulfat zugesetzt, um hybride Kolonien zu selektieren. Die selektierten Hybriden trugen das vollständige Nicotiana plumbaginifolia-Genom und Minichromosomen mit YAC-Sequenzen und dem Kanamycinresistenzgen.

[0061] Die gleiche Vorgehensweise wurde angewendet, um asymmetrische somatische Hybride zwischen bestrahlten Protoplasten von Nicotiana tabacum und Nicotiana sylvestris, die mit pIC461, pIC462 oder pYAC-GN transformiert worden waren, und Protoplasten von Nicotiana plumbaginifolia zu erzeugen.

Beispiel 3: Genomische in situ-Hybridisierung (GISH)

[0062] In dem Verfahren zur Erzeugung von asymmetrischen somatischen Hybriden ist es erforderlich, die Fremd-DNA und das Empfänger-Genom unzweideutig zu identifizieren. In der Vergangenheit verwendete Verfahren umfassen die Analyse von chromosomalen Genen, Markergenen und Spezies-spezifischen Wiederholungssequenzen. Die Verwendung von zytogenetischen Markern, um Chromosomen in Chromosomensegmenten zu identifizieren, war auf Chromosomen beschränkt, die sich in der Größe oder Morphologie signifikant unterschieden.

[0063] Die Anwendung der genomischen in situ-Hybridisierung, bei welcher genomische Gesamt-DNA als Sonde verwendet wird, kann verwendet werden, um die Herkunft von chromosomalem Material in asymmetrischen Hybriden zu bestimmen, wie in Parokonny et al., Plant Journal 2: 863–874 (1992), beschrieben.

Experimentelle Vorgehensweisen:

Pflanzenmaterial

[0064] Schösslingskulturen von Nitratreduktase-defizienten Mutanten von N. plumbaginifolia (cnx 20 und Nia 26, beide mit 2n = 20) und eine Chlorophyll-defiziente Mutante von N. sylvestris CV-42, 2n = 24) wurden kultiviert, wie von Negrutiu et al., Theor. Appl. Genet. 66: 341–347 (1983), beschrieben. Ein autotetraploider Zytotyp von N. plumbaginifolia (2n = 4x = 40), der als Kontrolle für die in situ-Hybridisierung verwendet wird, wurde durch somatische Verdopplung ausgehend von Wildtyp-Material erzeugt. In in vitro-Kultur eingebrachte Wildtyp-A. belladonna wurde als Kontrolle für Dot-Blot-Hybridisierungen verwendet. Das gesamte Material war ursprünglich am Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, Kiev, gezogen und am Jodrell Laboratory, Royal Botanic Gardens, Kiev, in in vitro-Kultur gehalten worden.

[0065] Asymmetrische somatische Hybride wurden durch Zellfusion von Blatt-Mesophyll-Protoplasten aus dem nicht-bestrahltem Ausgangsmaterial (Empfänger) mit gammabestrahlten Mesophyll-Protoplasten von dem anderen (Donor) erhalten. Vor der Fusion verabreichte Bestrahlungsdosen reichten von 10 bis 1000 Gy. Regeneranten entstammten von individuellen nukleären hybriden Kolonien der verschiedenen Fusionskombinationen. Die Regenerante Oct-3 war ein Produkt einer symmetrischen Zellfusion zwischen Mesophyll-Protoplasten von N. plumbaginifolia cnx 20 und einer Lysin-überproduzierenden Mutante von N. sylvestris (ALC; Negrutiu et al., Theor. Appl. Genet. 68: 11–20 (1981)) ohne frühere Bestrahlung von einem der Ausgangsmaterialien (Famelaer et al., Plant Sci. 61: 105–117 (1989)). Regeneranten wurden kultiviert, wie von Negrutiu et al., Theor. Appl. Genet. 66: 341–347 (1983) und Korostash et al., Biopolymers and the Cell 7: 55–62 (1991), beschrieben.

DNA-Isolierung

[0066] Ungefähr 0,5 bis 1 mg genomische DNA wurden aus drei bis vier jungen Blättern von N. plumbaginifolia cnx 20 und N. sylvestris V-42 unter Verwendung der Minipräparationstechnik von Dvorak et al., Theor. Appl. Genet. 63: 349–360 (1982), extrahiert.

Dot-Blot-Hybridisierung

[0067] Proben, welche zwischen 0,02 g und 0,4 g genomische DNA enthielten, wurden in 0,4 M NaOH, 10 mM EDTA denaturiert, 10 min gekocht und in 3 M Ammoniumacetat (pH 7,0) neutralisiert. Diese wurden in verschiedene Vertiefungen eines Bio-Rad-Dot-Blotters in einem Endvolumen von jeweils 100 l eingefüllt. Identische Verdünnungsreihen wurden für DNA aus N. sylvestris, N. plumbaginifolia und A. belladonna hergestellt. Blots wurden mit 0,5 g ml-1 biotinylierter genomischer Gesamt-DNA aus N. sylvestris v-42 unter Verwendung der von Parokonny et al., Plant J. 2: 695–704 (1992), beschriebenen Methode hybridisiert. Markierte DNA wurde unter Verwendung des BRL DNA Detection-Kits (Life Technologies) detektiert.

DNA-Sonden

Genomische Gesamt-DNA

[0068] Für eine Verwendung als Sonde für GISH wurden 3 g genomische Gesamt-DNA vor der Markierung, wie nachfolgend beschrieben, durch Vortexen für 10–30 s geschert.

[0069] (TTTAGGG)n. Eine Sonde mit hohem Molekulargewicht, welche durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) in Konkatemer-Form verkettet worden war ausgehend von einem synthetischen Oligomer, welches zu der Consensus-Sequenz der telomeren Wiederholungssequenz von A. thaliana (5'-TTTAGGG-3'; Richards et al., Cell 53: 127–136 (1988)) homolog war, wurde freundlicherweise von A. V. Cox (Jodrell Laboratory, Royal Botanic Gardens, Kiev) zur Verfügung gestellt.

[0070] pTa71. Eine Sonde, welche die ribosomalen Gene 5.8S, 18S und 25S und einen Teil des intergenischen Spacers aus Weizen (pTa71; Gerlach et al., Nucl. Acids Res. 7: 1869–1885 (1979)), umkloniert in pUC18, enthielt, wurde freundlicherweise von Dr. Kevin Jones, Department of Botany, University of Reading, zur Verfügung gestellt.

DNA-Sonden-Markierung

[0071] Sonden-DNA wurde mit Biotin-14-dATP (Life Technologies, Paisley, Vereinigtes Königreich) durch Nick-Translation markiert, wie vom Hersteller empfohlen. Nicht-eingebaute Nukleotide wurden durch Spin-Dialyse (Zentrifugationsdialyse) durch eine 200 l-Sepharose CL-6B (Pharmacia)-Säule (Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982) entfernt. Wenn die Sonde für eine in situ-Hybridisierung verwendet werden sollte, wurde zu diesem Zeitpunkt ein 30-facher Überschuss von gescherter denaturierter Lachshoden-DNA zugesetzt. Die Mischung wurde dann einmal in Ethanol präzipitiert und in 20 l TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) rekonstitutiert. Das Auftropfen eines Aliquots von markierter DNA auf Nitrocellulose und Detektieren von markierter DNA unter Verwendung des BRL DNA Detection-Kits (Life Technologies) testete den Biotin-Einbau.

Chromosomenpräparationen

[0072] Wurzelspitzen wurden in 0,035% Colchicin (Sigma, Poole, Vereinigtes Königreich) 1,5 h bei Raumtemperatur vorbehandelt, in 3:1 Ethanol:Essigsäure für bis zu 2 Wochen bei 4°C fixiert und in 70%-igem Ethanol bei –20°C aufbewahrt. Wurzelspitzen wurden in 45%-iger Essigsäure auf Objektträgern, die mit Vectabond (Vector Laboratories, Petersborough, Vereinigtes Königreich) behandelt worden waren, um die Zellanheftung zu unterstützen, zerquetscht. Objektträger wurden trocken bei –20°C eine bis zwei Wochen vor der Weiterverarbeitung aufbewahrt. Sie wurden dann in 3:1 Ethanol:Essigsäure für 30 min und 2 × 10 min in absolutes Ethanol eingetaucht, luftgetrocknet und mit 50 g m-1 DNase-freier RNase in 2 × SSC 2 h bei 37°C behandelt. Nach der Dehydratisierung durch eine Alkohol-Reihe wurden sie in einem Vakuumexsikkator über Nacht bei 4°C getrocknet.

In situ-Hybridisierung

[0073] Das für die in situ-Hybridisierung verwendete Verfahren war, wie von Parokonny et al., Plant J. 2: 695–704 (1992), beschrieben. Die Hybridisierungsmischung bestand aus 10% Dextransulfat, 50% Formamid, 450 g m-1 beschallter, gescherter Lachssperma-DNA und biotinylierter Sonde in Endkonzentrationen von 15 g ml-1, 5 g ml-1 bzw. 200 ng ml-1 für GISH, (TTTAGGG)n bzw. pTa71. Nachhybridisierungs-Wäschen erfolgten in 2 × SSC bei 42°C, 50% Formamid, 50% 2 × SSC bei 42°C und 2 × SSC bei Raumtemperatur. Biotinylierte DNA wurde detektiert mittels fluoreszierend markiertem Avidin unter Verwendung einer Amplifikation mit biotinyliertem anti-Avidin D, wie von Schwarzacher et al., Ann. Bot. 64: 315–324 (1989), beschrieben. Nicht-hybridisierte DNA wurde durch Anfärben mit 0,5 g ml-1 Propidiumiodid sichtbar gemacht. Chromatin aus beiden Ausgangsmaterialien wurde durch Gegenfärbung mit 2 g ml-1 Diaminidophenylindol (DAPI) detektiert. Die Fluoreszenz wurde mit einem Axiophot-Mikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) unter Verwendung eines Zeiss-Filterblocks 9 (Anregung 450–490 nm) für eine gleichzeitige Detektion von fluoreszierend markiertem Avidin und Propidiumiodid, und eines Zeiss-Filterblocks 1 (Anregung 365 nm) für DAPI betrachtet.

[0074] GISH wurde zur Lokalisierung und (von DNA) aus jeder Ausgangsspezies in Metaphase-Ausbreitungen (Metaphase-Spreads) von asymmetrischen somatischen Hybriden verwendet. Jede der 31 Pflanzen, die von einer unterschiedlichen nukleären Hybride abstammten, wurde durch GISH getestet. Der bestrahlte Donor für 17 von diesen war N. sylvestris und die restlichen 14 waren N. plumbaginifolia. Die Chromosomen aus N. sylvestris fluoreszierten gelb und jene aus N. plumbaginifolia fluoreszierten rot. Anhand der Farbe von ihrer Fluoreszenz konnte die die Spezies betreffende Herkunft in umgelagerten Chromosomen unzweideutig bestimmt werden. Durch Gegenfärbung mit DAPI wurden Minichromosome identifiziert und das Donor-Chromosom konnte anhand der Farbe der Fluoreszenz identifiziert werden. Die in situ-Hybridisierung lokalisierte die telomere Wiederholungssequenz an den Termini aller Chromosome. Signale für die Telomerregion konnten auch an Chromosomen festgestellt werden,

bei welchen große Abschnitte nach der Bestrahlung deletiert worden waren.

INDUSTRIELLE ANWENDBARKEIT

[0075] Die Erfindung ist anwendbar auf die landwirtschaftliche Biotechnologie und insbesondere auf die Manipulation des Pflanzengenoms, um künstliche Pflanzenchromosomen herzustellen, und die Einführung von nicht-nativer Nukleinsäure in Pflanzen unter Verwendung der künstlichen Chromosome.

[0076] Alle in diesen Unterlagen erwähnten Veröffentlichungen zeigen das Niveau der Fachkenntnisse von Fachleuten auf dem Gebiet, auf welches die Erfindung sich bezieht, an.

[0077] Den Fachleuten auf diesem Gebiet werden verschiedene Modifizierungen der hier beschriebenen Erfindung ersichtlich werden. Solche Modifizierungen sollen in den Umfang der beigefügten Ansprüche fallen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines künstlichen Pflanzenchromosoms, welches umfasst:
(a) Herstellen von rekombinanten Protoplasten von einer ersten Pflanzenspezies, welche eine exogene Nukleinsäure, welche ein Gen von Interesse umfasst, enthalten;
(b) Erzeugen von Chromosomenfragmenten von Chromosomen, die in den rekombinanten Protoplasten enthalten sind;
(c) Fusionieren der rekombinanten Protoplasten von (b) mit Protoplasten einer zweiten Pflanzenspezies, um fusionierte Protoplasten zu erzeugen, wobei die erste und die zweite Pflanzenspezies gleich oder unterschiedlich sein können; und
(d) Identifizieren von fusionierten Protoplasten von (c) oder von Zellen, die von den fusionierten Protoplasten von (c) abgeleitet sind, die Chromosomenfragmente enthalten, welche das Gen von Interesse umfassen und normale pflanzenchromosomale Aktivitäten zeigen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei (b) ein Bestrahlen der Protoplasten umfasst.

3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei (b) ein Inkontaktbringen der Protoplasten mit einem chemischen Mittel umfasst.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei das chemische Mittel Calicheamicin, Esperamicin, Dynemicin oder Neocarzinostatin ist.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Identifizieren von (d) eine Puls-Feld-Gelelektrophorese umfasst.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die zweite Pflanzenspezies die gleiche wie die erste Pflanzenspezies ist.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die zweite Pflanzenspezies ein Mitglied der gleichen Familie wie die erste Pflanzenspezies ist.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die erste Pflanzenspezies eine monokotyledone Pflanzenspezies ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die erste Pflanzenspezies eine dikotyledone Pflanzenspezies ist.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, welches des Weiteren (e) ein Regenerieren einer vollständigen Pflanze aus den rekombinanten Protoplasten von (a) vor (b) umfasst.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, welches des Weiteren (f) ein Regenerieren einer vollständigen Pflanze aus den fusionierten Protoplasten oder Pflanzenzellen, die in Anspruch 1 (d) identifiziert werden, umfasst.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die exogene Nukleinsäure wenigstens eine Rekombinationsstelle umfasst.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei die exogene Nukleinsäure wenigstens eine Restriktionsstelle umfasst.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei die exogene Nukleinsäure wenigstens eine kodierende Region umfasst.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei die exogene Nukleinsäure wenigstens eine Sequenz, welche ein chromosomales Element aus Hefe umfasst, umfasst.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei die exogene Nukleinsäure ein künstliches Hefe-Chromosom umfasst.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, wobei die exogene Nukleinsäure eine Sequenz, welche einen selektierbaren Marker kodiert, umfasst.

18. Verfahren zum Herstellen einer transgenen Pflanze, welches umfasst:
(a) Herstellen von rekombinanten Protoplasten von einer ersten Pflanzenspezies, welche eine exogene Nukleinsäure, welche ein Gen von Interesse umfasst, enthalten;
(b) Erzeugen von Chromosomenfragmenten von Chromosomen, die in den rekombinanten Protoplas-

ten enthalten sind;
(c) Fusionieren der rekombinanten Protoplasten von (b) mit Protoplasten einer zweiten Pflanzenspezies, um fusionierte Protoplasten zu erzeugen, wobei die erste und die zweite Pflanzenspezies gleich oder unterschiedlich sein können;
(d) Identifizieren von fusionierten Protoplasten von (c) oder von Zellen, die von den fusionierten Protoplasten von (c) abgeleitet sind, die Chromosomenfragmente enthalten, welche normale pflanzenchromosomale Aktivitäten zeigen; und
(e) Regenerieren einer vollständigen Pflanze aus den Protoplasten oder Zellen, die in (d) identifiziert werden, die die Chromosomenfragmente, welche das Gen von Interesse umfassen und normale pflanzenchromosomale Aktivitäten zeigen, enthalten.

19. Verfahren zum Herstellen eines künstlichen Pflanzenchromosoms, welches umfasst:
(a) Erzeugen von transformierten Pflanzen von einer ersten Pflanzenspezies, welche eine exogene Nukleinsäure, welche ein Gen von Interesse umfasst, enthalten;
(b) Erzeugen von Chromosomenfragmenten von Chromosomen von der ersten Pflanzenspezies;
(c) Kreuzen der ersten Pflanzenspezies, welche die Chromosomenfragmente enthält, mit einer zweiten Pflanzenspezies, um hybride Pflanzenspezies zu erzeugen, wobei die erste und die zweite Pflanzenspezies gleich oder unterschiedlich sein können; und
(d) Identifizieren von hybriden Pflanzenspezies von (c) oder von Zellen oder Protoplasten davon, welche wenigstens ein Chromosomenfragment, welches das Gen von Interesse umfasst und normale pflanzenchromosomale Aktivitäten zeigt, enthalten.

20. Isolierte Pflanzenzellen oder Protoplasten, enthaltend wenigstens ein Pflanzenchromosomenfragment, welches normale chromosomale Aktivitäten zeigt, hergestellt durch das Verfahren von Anspruch 1, wobei das Chromosomenfragment das Gen von Interesse umfasst.

21. Kultur von Protoplasten oder Pflanzenzellen, die in Anspruch 1 (d) identifiziert werden.

22. Vollständige Pflanze, die durch das Verfahren von Anspruch 11 erzeugt wird.

23. Vollständige Pflanze nach Anspruch 22, die eine monokotyledone Pflanze ist.

24. Vollständige Pflanze nach Anspruch 22, die eine dikotyledone Pflanze ist.

25. Saatgut, welches von der vollständigen Pflanze von Anspruch 22 abgeleitet ist, wobei das Saatgut das Gen von Interesse umfasst.

26. Vollständige Pflanze, die durch das Verfahren von Anspruch 18 regeneriert worden ist.

27. Pflanzenzellkultur, welche von der vollständigen Pflanze von Anspruch 25 abgeleitet wird.

28. Saatgut, welches von der vollständigen Pflanze von Anspruch 26 abgeleitet wird.

29. Hybride Pflanzenspezies oder Zellen oder Protoplasten davon, enthaltend wenigstens ein Chromosomenfragment, welches normale pflanzenchromosomale Funktionen zeigt, erzeugt durch das Verfahren von Anspruch 19, wobei das Chromosomenfragment das Gen von Interesse umfasst.

30. Verfahren nach Anspruch 15, wobei das chromosomale Element aus Hefe eine erste Zentromersequenz, welche in einer Hefezelle funktionsfähig ist, umfasst.

31. Verfahren nach Anspruch 30, wobei die Chromosomenfragmente des Weiteren eine zweite Zentromersequenz, welche in einer Pflanzenzelle funktionsfähig ist, umfassen.

32. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die exogene Nukleinsäure des Weiteren wenigstens ein chromosomales Element aus Hefe umfasst.

33. Verfahren nach Anspruch 32, wobei das chromosomale Element aus Hefe eine erste Zentromersequenz, welche in einer Hefezelle funktionsfähig ist, umfasst.

34. Verfahren nach Anspruch 33, wobei das Chromosomenfragment eine zweite Zentromersequenz, welche in einer Pflanzenzelle funktionsfähig ist, umfasst.

35. Rekombinante Nukleinsäure, umfassend eine erste Zentromersequenz, welche in einer Hefezelle funktionsfähig ist, und eine zweite Zentromersequenz, welche in einer Pflanzenzelle funktionsfähig ist, isoliert aus den fusionierten Protoplasten von (d) in Anspruch 31 oder von (d) in Anspruch 34, wobei die rekombinante Nukleinsäure normale pflanzenchromosomale Aktivitäten zeigt.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

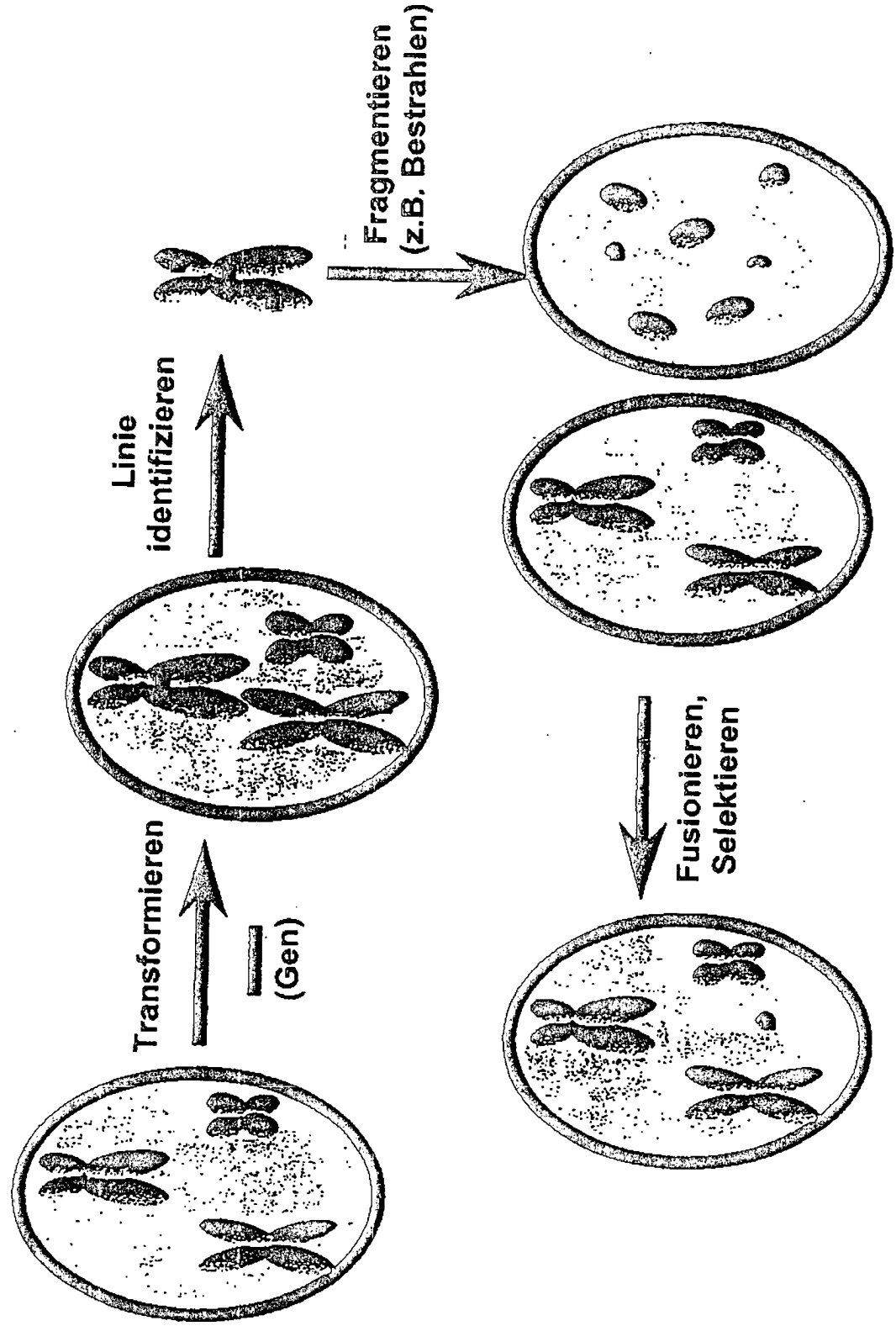
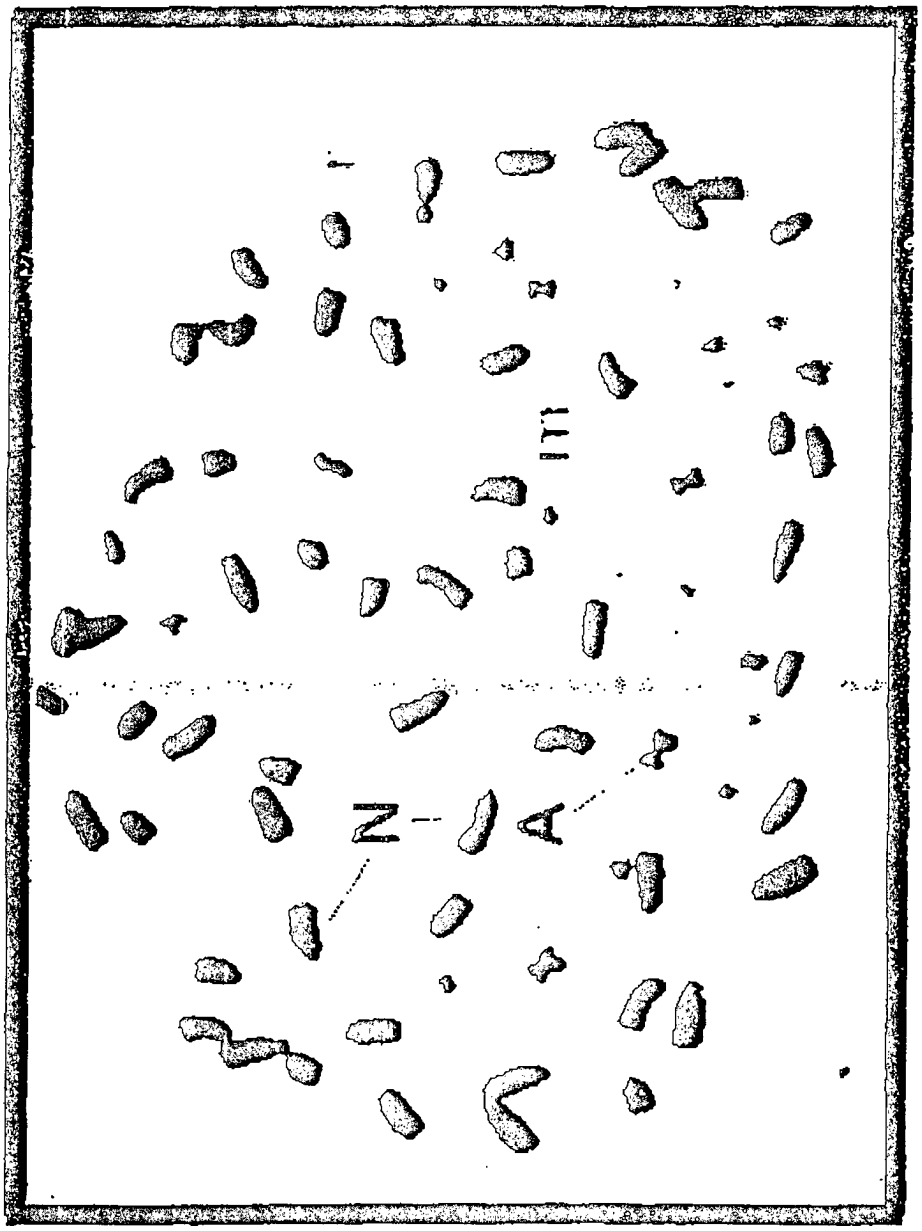


FIG. 1

FIG. 2



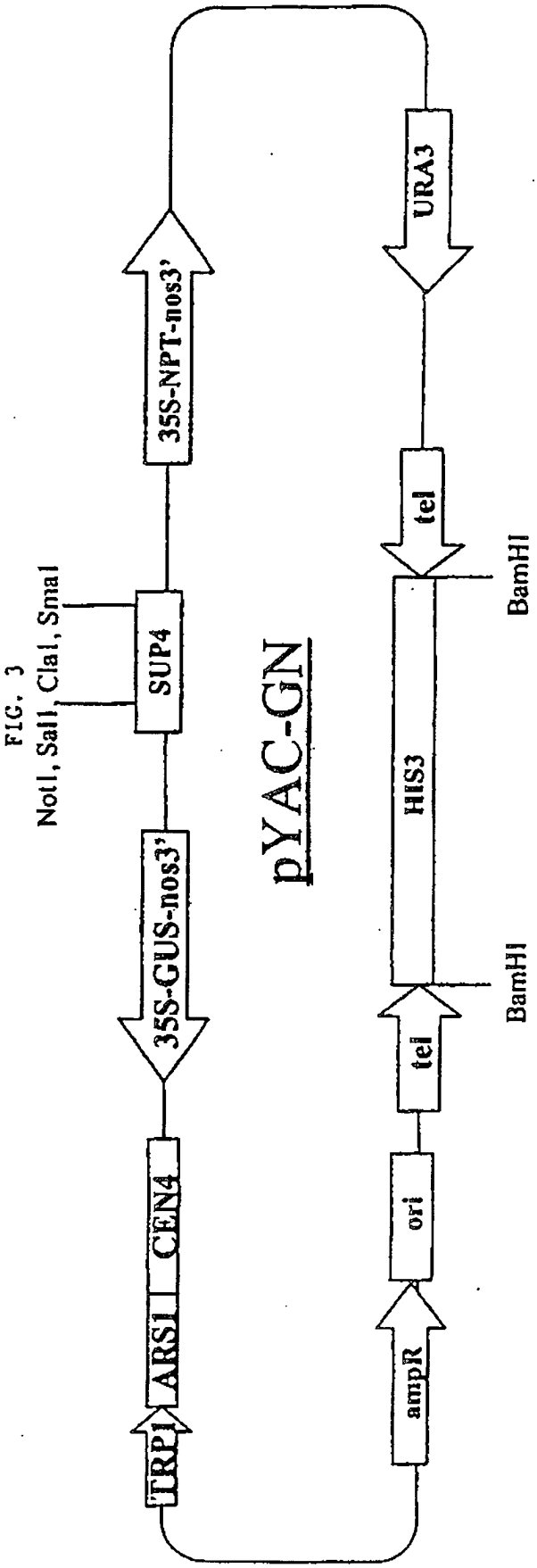


FIG. 3
NotI, SalI, ClaI, SmaI

FIG. 4A

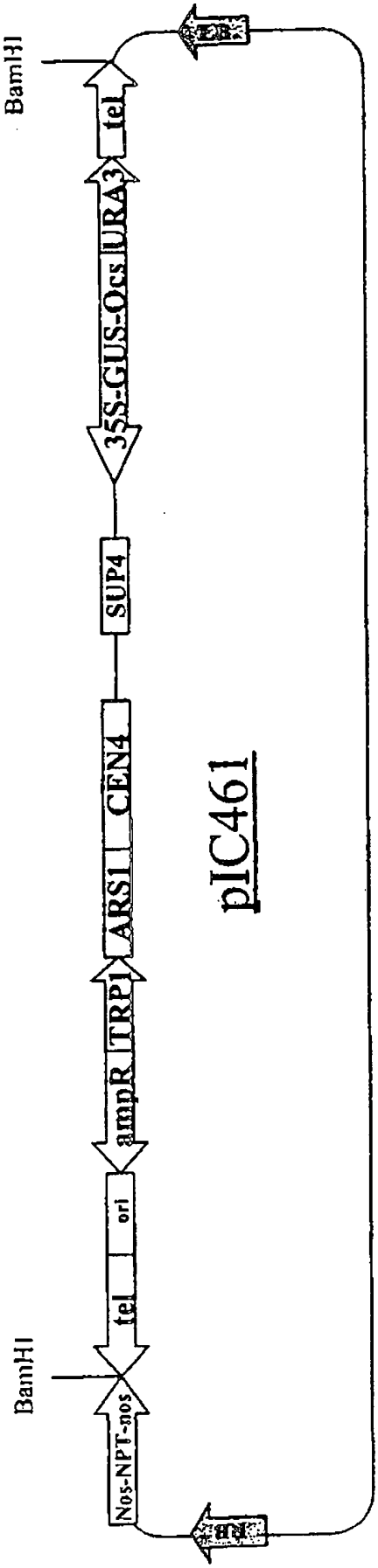
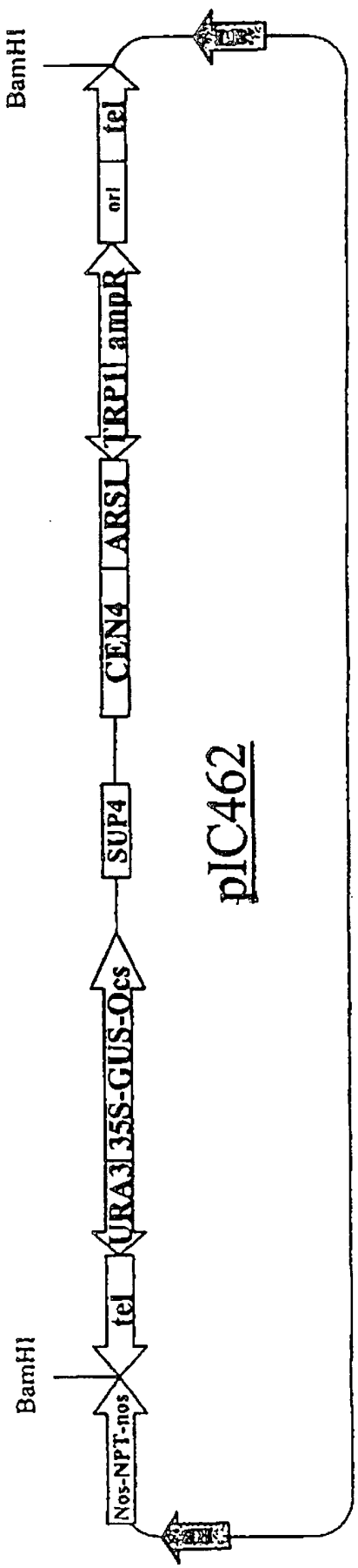

pIC461
BamHI
tel
35S-GUS-Ocs
URA3
SUP4
CEN4
ARS1
TRP1
ampR
ori
tel
Nos-NPT-nos
BamHI

FIG. 4B


pIC462
BamHI
tel
ori
TRP1
ampR
ARS1
CEN4
SUP4
URA3
35S-GUS-Ocs
tel
Nos-NPT-nos
BamHI