

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
6. März 2008 (06.03.2008)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2008/025711 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation:  
C12N 15/82 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2007/058735

(22) Internationales Anmeldedatum:  
22. August 2007 (22.08.2007)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
06119815.6 30. August 2006 (30.08.2006) EP

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): **BASF PLANT SCIENCE GMBH** [DE/DE]; BPS-  
A30, 67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **DOUCHKOV, Dimi-  
tar** [BG/DE]; Hans-Stubbe-Strasse 11, 06466 Gatersleben  
(DE). **SCHWEIZER, Patrick** [CH/DE]; Schillerstrasse 5,  
06493 Ballenstedt (DE).

(74) Anwalt: **NEUEFEIND, Regina**; Maiwald Patentanwalts  
GmbH, Elisenhof, Elisenstrasse 3, 80335 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,  
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA,  
CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE,  
EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID,  
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN,  
MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,  
PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV,  
SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,  
ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,  
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,  
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,  
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,  
MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF,  
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,  
TG).

**Veröffentlicht:**

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-  
öffentlichen nach Erhalt des Berichts
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektro-  
nischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom In-  
ternationalen Büro erhältlich

(54) Title: METHOD FOR INCREASING RESISTANCE TO PATHOGENS IN TRANSGENIC PLANTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ERHÖHUNG DER PATHOGENRESISTENZ IN TRANSGENEN PFLANZEN

(57) Abstract: The present invention relates to a method for increasing the resistance to pathogens in transgenic plants and/or plant cells, where a DNA sequence which codes for a protein with a leucine-rich repeat (LRR) domain and/or with a kinase activity is introduced into the plant or plant cell and expressed therein. The present invention likewise relates to the use of nucleic acids which code for such a protein for producing transgenic plants or plant cells with an increased resistance to pathogens. The present invention further relates to a nucleic acid sequences which code for a protein which confers an increased resistance to pathogens in plants.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erhöhung der Pathogenresistenz in transgenen Pflanzen und/oder Pflanzenzellen, wobei eine DNA-Sequenz, die für ein Protein mit einer leucine-rich-repeat (LRR)-Domäne und/oder einer Kinaseaktivität kodiert, in die Pflanze bzw. Pflanzenzelle eingeführt und dort exprimiert wird. Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls die Verwendung von Nukleinsäuren, die für ein solches Protein kodieren, zur Herstellung von transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit einer erhöhten Pathogenresistenz. Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung Nukleinsäuresequenzen, die für ein Protein kodieren, das eine erhöhte Pathogenresistenz in Pflanzen vermittelt.



WO 2008/025711 A2

### Verfahren zur Erhöhung der Pathogenresistenz in transgenen Pflanzen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erhöhung der Pathogenresistenz in transgenen Pflanzen und/oder Pflanzenzellen, wobei eine DNA-Sequenz, die für ein Protein mit einer leucine-rich-repeat (LRR)-Domäne und/oder einer Kinaseaktivität kodiert, in die Pflanze bzw. Pflanzenzelle eingeführt und dort exprimiert wird. Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls die Verwendung von Nukleinsäuren, die für ein solches Protein kodieren, zur Herstellung von transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit einer erhöhten Pathogenresistenz. Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung Nukleinsäuresequenzen, die für ein Protein kodieren, das eine erhöhte Pathogenresistenz in Pflanzen vermittelt.

Pflanzenkrankheiten, die durch verschiedene Pathogene wie z.B. Viren, Bakterien und Pilzen verursacht werden, können beim Anbau von Kulturpflanzen zu erheblichen Ernteaufgängen führen, was zu erheblichen wirtschaftlichen Folgen hat, aber auch die Sicherheit der menschlichen Ernährung bedroht. Seit dem letzten Jahrhundert werden zur Kontrolle von Pilzkrankheiten chemische Fungizide eingesetzt. Durch den Einsatz dieser Stoffe konnte zwar das Ausmaß von Pflanzenerkrankungen reduziert werden, es ist allerdings bis heute nicht auszuschließen, dass diese Verbindungen eine schädliche Wirkung auf Mensch, Tier und Umwelt ausüben. Um langfristig den Verbrauch von herkömmlichen Pflanzenschutzmitteln auf ein Minimum zu reduzieren, ist es daher von Bedeutung, die natürliche Pathogenabwehr von verschiedenen Pflanzen gegenüber unterschiedlichen Erregern zu untersuchen und sie sich durch gentechnologische Manipulation, z.B. durch das Einführen externer Resistenzgene oder durch die Manipulation der endogenen Genexpression in den Pflanzen, zur Herstellung von pathogenresistenten Pflanzen gezielt nutzbar zu machen.

Es gibt nur wenige Ansätze, die Pflanzen eine Resistenz gegenüber Pathogenen, vor allem Pilzpathogenen, verleihen. Dieser Mangel ist zum Teil in der Komplexität der

betrachteten biologischen Systeme begründet. Dem Erreichen von Resistenzen gegenüber Pathogenen steht auch entgegen, dass über die Wechselwirkungen zwischen Pathogen und Pflanze wenig bekannt ist. Die große Anzahl unterschiedlicher Pathogene, die von ihnen entwickelten Infektionsmechanismen und die von den Pflanzenstämmen, Familien und Arten entwickelten Abwehrmechanismen stehen in vielfältigen Wechselwirkungen miteinander.

Pilzpathogene haben im wesentlichen zwei Infektionsstrategien entwickelt. Manche Pilze dringen über die Spaltöffnungen in das Wirtsgewebe ein (z.B. Rostpilze, Septoria-, Fusarium-Arten) und penetrieren das Mesophyllgewebe, während andere über die Cuticula die darunter liegenden Epidermiszellen penetrieren (z.B. Blumeria-Arten).

Die durch die Pilzpathogene verursachten Infektionen führen in den befallenen Pflanzen zur Aktivierung der pflanzlichen Abwehrmechanismen. So konnte gezeigt werden, dass Abwehrreaktionen gegen Epidermis-penetrierende Pilze häufig mit der Ausbildung einer Penetrationsresistenz (Papillenbildung, Zellwandverdickungen mit Kallose als Hauptbestandteil) unterhalb der pilzlichen Penetrationshyphe beginnen (Elliott et al. (2002) Mol. Plant Microbe Interact. 15: 1069-77).

Die pflanzlichen Abwehrmechanismen vermitteln jedoch in vielen Fällen nur einen unzureichenden Schutzmechanismus gegenüber Pathogenbefall.

Die Ausbildung einer Penetrationsresistenz gegenüber Pathogenen, deren Infektionsmechanismus eine Penetration der Epidermis- oder Mesophyllzellen beinhaltet, ist sowohl für monokotyledone als auch dikotyledone Pflanzen von großer Bedeutung. Sie kann vermutlich im Gegensatz zu anderen Ansätzen zur

Resistenzvermittlung die Ausbildung einer Breitspektrum-Resistenz gegen obligat biotrophe, hemibiotrophe und nekrotrophe Pilze ermöglichen.

Bisher wurden zur Erzeugung pilzresistenter Pflanzen häufig quantitative  
5 Resistenzmerkmale (Resistenz-QTLs) eingekreuzt. Dieses Verfahren hat aber den Nachteil, dass oft unerwünschte Merkmale mit eingekreuzt werden. Darüber hinaus sind die dazu benötigten Züchtungsmethoden sehr kompliziert und zeitaufwendig.

Daher lag der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur  
10 Erhöhung der Resistenz von Pflanzen gegen penetrierende Pathogene bereitzustellen.

Die Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen charakterisierten Ausführungsformen gelöst.

15 Folglich betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Erhöhung der Pathogenresistenz in transgenen Pflanzen und/oder Pflanzenzellen, wobei eine DNA-Sequenz, die für ein Protein kodiert, welches eine erhöhte Pathogenresistenz, bevorzugt eine erhöhte Pilzpathogenresistenz, vermittelt, in die Pflanze bzw. Pflanzenzelle eingeführt und dort exprimiert wird.

20

Im Rahmen einer TIGS (=Transient Induced Gene Silencing)-Analyse in Gerste nach der Methode von Schweizer et al. (2001) wurde gefunden, dass durch ein dsRNAi-vermitteltes Silencing des Gens RNR8 die Empfänglichkeit der Pflanze für das Pilzpathogen *Blumeria graminis* erhöht ist und daher das Gen RNR8 eine Rolle bei  
25 der Vermittlung der Pathogenresistenz von Gerstepflanzen spielen könnte.

RNR8 gehört zu der Familie der leucine-rich-repeat (LRR)-enthaltenden Proteine mit einer Kinasedomäne bzw. einer Kinaseaktivität. Mitglieder dieser Familie spielen in

verschiedenen zellulären Prozessen wie der Regulation der Endosperm- und Pollenentwicklung (Li und Wurtzel (1998) *Plant Mol. Biol.* 37: 749-761; Muschiatti et al. (1998) *Plant Cell* 10: 319-330), der Regulation der Meristem- und Blütenentwicklung (Torii et al. (1996) *Plant Cell* 8: 735-746; Clark et al. (1997) *Cell* 89: 575-585; Kim et al. (2000) *Plant Sci.* 152: 17-26) und dem Gibberellin-induzierten Sprosswachstum (van der Knapp et al. (1999) *Plant Physiol.* 120: 559-569) eine wichtige Rolle. Die LRR-Domäne umfasst 2 bis 45 Wiederholungen einer Aminosäuresequenz mit 20 bis 30 Aminosäuren und faltet sich im allgemeinen in Hufeisenform.

10

Von einem weiteren Mitglied dieser Familie, OsXa21 aus Reis, konnte gezeigt werden, dass es Resistenz gegenüber dem bakteriellen Pathogen *Xanthomonas oryzae* vermittelt (Song et al. (1995) *Science* 270(5243): 1804-1806). Das erfindungsgemäße Protein weist zu OsXa21 nur eine sehr schwache

15 Sequenzhomologie von etwa 23% auf.

Die erfindungsgemäßen Proteine vermitteln eine Erhöhung der Pathogenresistenz, bevorzugt der Resistenz gegen Pilzpathogene, in Pflanzen. Sie zeichnen sich bevorzugt dadurch aus, dass sie entweder eine leucine-rich-repeat (LRR)-Domäne oder eine Kinaseaktivität aufweisen, besonders bevorzugt weisen die erfindungsgemäßen Proteine beide Merkmale auf. Ohne an eine Hypothese gebunden sein zu wollen, wird gegenwärtig davon ausgegangen, dass entweder die Kinaseaktivität oder die LRR-Domäne oder beide Merkmale gemeinsam für die Vermittlung der Pathogenresistenz verantwortlich sind. Im Folgenden wird der Einfachheit halber der Begriff des „erfindungsgemäßen Proteins“ verwendet.

25

Die Nukleinsäuresequenz, die im Verfahren der vorliegenden Erfindung in die Pflanze bzw. Pflanzenzelle eingeführt wird und die für ein erfindungsgemäßes Protein kodiert, ist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- 5           i)     Nukleinsäuresequenzen umfassend Nukleotidsequenzen, die den kodierenden Sequenzen von SEQ ID No. 1 oder Fragmenten davon entsprechen,
- ii)     Nukleinsäuresequenzen umfassend Nukleotidsequenzen, die für ein Protein mit der in SEQ ID No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz  
10           oder Fragmenten davon kodieren,
- iii)    Nukleinsäuresequenzen umfassend Nukleotidsequenzen, die zu den kodierenden Sequenzen von SEQ ID No. 1 eine Sequenzidentität von mindestens 60% aufweisen, und/oder
- iv)     Nukleinsäuresequenzen umfassend Nukleotidsequenzen, die unter  
15           stringenten Bedingungen mit einem komplementären Strang einer Nukleotidsequenz von i) bis iii) hybridisieren.

”Resistenz” bedeutet das Verhindern, das Reprimieren, das Vermindern oder Abschwächen von Krankheitssymptomen einer Pflanze, die infolge eines Befalls  
20           durch ein Pathogen auftreten. Die Symptome können vielfältiger Art sein, umfassen aber bevorzugt solche, die direkt oder indirekt zu einer Beeinträchtigung der Qualität der Pflanze, der Quantität des Ertrages, der Eignung zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel führen oder aber auch Aussaat, Anbau, Ernte oder Prozessierung des Erntegutes erschweren.

25           In einer bevorzugten Ausführungsform werden die folgenden Krankheitssymptome abgeschwächt, vermindert oder verhindert: Bildung von Pusteln und Sporienlagern auf den Oberflächen der befallenen Gewebe, Mazeration der Gewebe, spreitende

Nekrosen des Gewebes, Akkumulation von Mykotoxinen z.B. aus *Fusarium graminearum* oder *F. culmorum*.

5 Eine "erhöhte Pathogenresistenz" bedeutet, dass die Abwehrmechanismen einer bestimmten Pflanze oder in einem Teil einer Pflanze, z.B. in einem Organ, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Organell, durch Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens im Vergleich zu einer geeigneten Kontrolle, z.B. dem Wildtyp der Pflanze („Kontrollpflanze“, „Ausgangspflanze“), auf den das erfindungsgemäße Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonsten gleichen Bedingungen (wie  
10 beispielsweise Klima- oder Anbaubedingungen, Pathogenart etc.) eine erhöhte Resistenz gegen ein oder mehr Pathogene aufweist. Vorzugsweise weisen in einer Pflanze mindestens die Epidermis und/oder Mesophyll-Gewebe oder die Organe, die ein Epidermis und/oder Mesophyll-Gewebe besitzen, eine erhöhte Resistenz gegen die Pathogene auf. Beispielsweise ist die Resistenz in den Blättern erhöht.

15

In einer Ausführungsform wird die Resistenz in Lemma (Deckspelze), palea (Vorspelze), und/oder Glume (Antherenanlage) erhöht.

20 Die erhöhte Resistenz äußert sich bevorzugt in einer verminderten Ausprägung der Krankheitssymptome, wobei die Krankheitssymptome - neben den oben erwähnten Beeinträchtigungen - auch beispielsweise die Penetrationseffizienz eines Pathogens in die Pflanze oder pflanzliche Zelle oder die Proliferationseffizienz des Pathogens in oder auf denselben umfassen. Dabei sind die Krankheitssymptome bevorzugt um mindestens 10 % oder mindestens 20 %, besonders bevorzugt um mindestens  
25 40 % oder 60 %, insbesondere bevorzugt um mindestens 70 % oder 80 %, am meisten bevorzugt um mindestens 90 % oder 95 % gegenüber der Kontrollpflanze vermindert.

“Pathogen” meint im Rahmen der Erfindung Organismen, deren Interaktionen mit einer Pflanze zu den oben beschriebenen Krankheitssymptomen führen, insbesondere meint Pathogene Organismen aus dem Reich der Pilze. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Pathogen um ein Epidermis- bzw. Mesophyllzellen penetrierendes Pathogen, besonders bevorzugt um Pathogene, die über Spaltöffnungen in Pflanzen eindringen und anschließend Mesophyllzellen penetrieren. Bevorzugt sind dabei Organismen der Stämme Ascomycota und Basidomycota genannt. Besonders bevorzugt sind dabei die Familien Blumeriaceae, Pucciniaceae, Mycosphaerellaceae und Hypocreaceae.

10

Besonders bevorzugt sind Organismen dieser Familien, die zu den Gattungen *Blumeria*, *Puccinia*, *Fusarium* oder *Mycosphaerella* zählen.

15

Ganz besonders bevorzugt sind die Arten *Blumeria graminis*, *Puccinia triticina*, *Puccinia striiformis*, *Mycosphaerella graminicola*, *Stagonospora nodorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium poae* und *Microdochium nivale*.

20

In besonders bevorzugten Ausführungsformen führt das erfindungsgemäße Verfahren zu einer Resistenz bei

- Gerste gegen das Pathogen *Puccinia graminis* f.sp. *hordei* (barley stem rust),
- bei Weizen gegen die Pathogene *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* (Wheat stem rust), *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*, *Puccinia striiformis*, *Septoria nodorum*, *Septoria tritici*

25

und/oder *Septoria avenae*,

- bei Mais gegen die Pathogene *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*, *Puccinia sorghi* und/oder *Puccinia polysora*,

- 8 -

- bei Sorghum gegen die Pathogene *Puccinia purpurea*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium graminearum* und/oder *Fusarium oxysporum*,
- bei Soja gegen die Pathogene *Phakopsora pachyrhizi* und/oder *Phakopsora meibromae*.

5

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Nukleinsäuremolekül, enthaltend eine Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- 10 i) Nukleinsäuresequenzen umfassend Nukleotidsequenzen, die den kodierenden Sequenzen von SEQ ID No. 1 oder Fragmenten davon entsprechen,
- ii) Nukleinsäuresequenzen umfassend Nukleotidsequenzen, die für ein Protein mit der in SEQ ID No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz oder Fragmenten davon kodieren,
- 15 iii) Nukleinsäuresequenzen umfassend Nukleotidsequenzen, die zu den kodierenden Sequenzen von SEQ ID No. 1 eine Sequenzidentität von mindestens 60% aufweisen, und/oder
- iv) Nukleinsäuresequenzen umfassend Nukleotidsequenzen, die unter stringenten Bedingungen mit einem komplementären Strang einer Nukleotidsequenz von i) bis iii) hybridisieren,
- 20 die für ein Protein kodiert, welches in Pflanzen eine erhöhte Pathogenresistenz, bevorzugt eine erhöhte Pilzpathogenresistenz vermittelt.

Der Begriff "Nukleinsäure(molekül)", wie hier verwendet, umfasst in einer bevorzugten Ausführungsform zudem die am 3'- und am 5'-Ende des kodierenden  
25 Genbereichs gelegene untranslatierte Sequenz: mindestens 500, bevorzugt 200, besonders bevorzugt 100 Nukleotide der Sequenz stromaufwärts des 5'-Endes des kodierenden Bereichs und mindestens 100, bevorzugt 50, besonders bevorzugt 20 Nukleotide der Sequenz stromabwärts des 3'-Endes des kodierenden Genbereichs.

Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül wird von anderen Nukleinsäuremolekülen abgetrennt, die in der natürlichen Quelle der Nukleinsäure vorliegen. Eine "isolierte" Nukleinsäure hat vorzugsweise keine Sequenzen, welche die Nukleinsäure in der genomischen DNA des Organismus, aus dem die Nukleinsäure stammt, natürlicherweise flankieren (z.B. Sequenzen, die sich an den 5'- und 3'-Enden der Nukleinsäure befinden). Bei verschiedenen Ausführungsformen kann das isolierte Molekül z.B. weniger als etwa 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb oder 0,1 kb an Nukleotidsequenzen enthalten, die natürlicherweise das Nukleinsäuremolekül in der genomischen DNA der Zelle, aus der die Nukleinsäure stammt, flankieren. Bei allen hier erwähnten Nukleinsäuremolekülen kann es sich z.B. um RNA, DNA oder cDNA handeln.

Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuremoleküle, z.B. ein Nukleinsäuremolekül mit einer Nukleotidsequenz der SEQ ID No. 1 oder einem Teil davon, können unter Verwendung molekularbiologischer Standardtechniken und der hier bereit gestellten Sequenzinformation isoliert werden. Auch können mit Hilfe von Vergleichsalgorithmen, wie sie z.B. auf der NCBI-Homepage unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> zu finden sind, beispielsweise eine homologe Sequenz oder homologe, konservierte Sequenzbereiche auf DNA- oder Aminosäureebene identifiziert werden. Wesentliche Teile dieser Sequenz oder die gesamte homologe Sequenz können als Hybridisierungssonde unter Verwendung von Standardhybridisierungstechniken (wie z.B. beschrieben in Sambrook et al., vide supra) zur Isolierung weiterer im Verfahren nützlicher Nukleinsäuresequenzen aus anderen Organismen durch das Screening von cDNA- und/oder genomischen Banken verwendet werden. Überdies lässt sich ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine vollständige Sequenz gemäß SEQ ID No. 1 oder einen Teil davon, durch Polymerasekettenreaktion isolieren, wobei Oligonukleotidprimer auf der Basis der hier angegebenen Sequenzen oder von Teilen davon verwendet werden (z.B. kann

ein Nukleinsäuremolekül, umfassend die vollständige Sequenz oder einen Teil davon, durch Polymerasekettenreaktion unter Verwendung von Oligonukleotidprimern isoliert werden, die auf der Basis dieser gleichen Sequenz erstellt worden sind). Zum Beispiel lässt sich mRNA aus Zellen isolieren (z.B. durch  
5 das Guanidiniumthiocyanat-Extraktionsverfahren von Chirgwin et al. (1979) Biochemistry 18: 5294 – 5299) und daraus mittels reverser Transkriptase (z.B. Moloney-MLV-Reverse Transkriptase, erhältlich von Gibco/BRL, Bethesda, MD oder AMV-Reverse-Transkriptase, erhältlich von Seikagaku Amerika, Inc., St. Petersburg, FL) cDNA herstellen. Synthetische Oligonukleotidprimer zur  
10 Amplifizierung mittels Polymerasekettenreaktion lassen sich auf der Basis der in SEQ ID No. 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz oder mit Hilfe der in SEQ ID No. 2 dargestellten Aminosäuresequenz erstellen. Eine erfindungsgemäße Nukleinsäure kann unter Verwendung von cDNA oder alternativ von genomischer DNA als Matrize und geeigneten Oligonukleotidprimern mittels  
15 Standard-PCR-Amplifikationstechniken amplifiziert werden. Die so amplifizierte Nukleinsäure kann in einen geeigneten Vektor kloniert werden und mittels DNA-Sequenzanalyse charakterisiert werden. Oligonukleotide, die einer Nukleotidsequenz entsprechen, welche für ein erfindungsgemäßes Protein kodiert, können durch Standardsyntheseverfahren, beispielsweise mit einem automatischen DNA-  
20 Synthesegerät, hergestellt werden.

Unter dem Begriff "Sequenzidentität" zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen wird die Identität der Nukleinsäuresequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge verstanden, in einer bevorzugten Ausführungsform über die gesamte exprimierte  
25 Sequenzlänge, bevorzugt cDNA, noch mehr bevorzugt über die codierende Sequenz, bevorzugt CDS, verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics



Bevorzugt wird unter "Identität zwischen zwei Proteinen" die Identität der Aminosäuresequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Gap Weight: 8

Length Weight: 2

Average Match: 2,912

Average Mismatch:-2,003

10

“Standardhybridisierungsbedingungen” ist breit zu verstehen und meint je nach Anwendung stringente oder weniger stringente Hybridisierungsbedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind unter anderem bei Sambrook und Russell, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 3. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001) oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. beschrieben.

15

Der Fachmann würde Hybridisierungsbedingungen auswählen, die es ihm ermöglichen, spezifische von unspezifischen Hybridisierungen zu unterscheiden.

20

Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrilles ausgewählt sein aus Bedingungen mit geringer Stringenz (mit ungefähr 2X SSC bei 50°C) und solchen mit hoher Stringenz (mit ungefähr 0.2X SSC bei 50°C, bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3M Natriumcitrat, 3M NaCl, pH 7.0). Darüberhinaus kann die

25

Temperatur während des Waschschrilles von niedrig stringenten Bedingungen bei Raumtemperatur, d.h. ungefähr 22°C, bis zu stärker stringenten Bedingungen bei ungefähr 65°C angehoben werden. Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig oder auch einzeln variiert werden, wobei der jeweils

andere Parameter konstant gehalten wird. Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50% Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt. Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschschrift sind infolge gegeben:

(1) Hybridisierungsbedingungen können zum Beispiel aus nachfolgenden Bedingungen ausgewählt sein:

- 10 a) 4X SSC bei 65°C,
- b) 6X SSC bei 45°C,
- 15 c) 6X SSC, 100 µg/ml denaturierte, fragmentierte Fischsperma-DNA bei 68°C,
- d) 6X SSC, 0,5 % SDS, 100 µg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA bei 68°C,
- 20 e) 6X SSC, 0,5 % SDS, 100 µg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA, 50 % Formamid bei 42°C.
- f) 50 % Formamid, 4X SSC bei 42°C,
- 25 g) 50 % (vol/vol) Formamid, 0,1% Rinderserumalbumin, 0,1 % Ficoll, 0,1 % Polyvinylpyrrolidon, 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,5, 750 mM NaCl, 75 mM Natriumcitrat bei 42°C,

- 14 -

- h) 2X oder 4X SSC bei 50°C (schwach stringente Bedingung),
- i) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42°C (schwach stringente Bedingung).
- 5
- j) 500 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2, 7% SDS (g/V), 1mM EDTA, 10µg/ml single stranded DNA, 0,5% BSA (g/V) (Church und Gilbert (1984) Proc. Natl. Acad.Sci. U.S.A. 81(7): 1991-1995.)
- 10 (2) Waschschritte können zum Beispiel aus nachfolgenden Bedingungen ausgewählt sein:
- a) 0,015 M NaCl/0,0015 M Natriumcitrat/0,1 % SDS bei 50°C,
- 15 b) 0.1X SSC bei 65°C,
- c) 0,1X SSC, 0,5 % SDS bei 68°C,
- d) 0,1X SSC, 0,5 % SDS, 50 % Formamid bei 42°C,
- 20 e) 0,2X SSC, 0,1 % SDS bei 42°C,
- f) 2X SSC bei 65°C (schwach stringente Bedingung).
- 25 In einer Ausführungsform werden die Hybridisierungsbedingungen wie folgt gewählt:

Es wird ein Hybridisierungspuffer gewählt, der Formamid, NaCl und PEG 6000 enthält. Die Anwesenheit von Formamid im Hybridisierungspuffer destabilisiert doppelsträngige Nukleinsäuremoleküle, wodurch die Hybridisierungstemperatur auf 42°C gesenkt werden kann, ohne dadurch die Stringenz zu erniedrigen. Die

- 5 Verwendung von Salz im Hybridisierungspuffer erhöht die Renaturierungsrate einer Duplex, bzw. die Hybridisierungseffizienz. Obwohl PEG die Viskosität der Lösung erhöht, was einen negativen Einfluß auf Renaturierungsraten ausübt, wird durch die Anwesenheit des Polymers in der Lösung die Konzentration der Sonde im verbleibenden Medium erhöht, was die Hybridisierungsrate steigert. Die Zusammen-
- 10 setzung des Puffers ist wie folgt:

Hybridisierungspuffer
250 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,2
1 mM EDTA
7 % SDS (g/v)
250 mM NaCl
10 µg/ml ssDNA
5 % Polyethylenglykol (PEG) 6000
40 % Formamid

Die Hybridisierungen werden bei 42°C über Nacht durchgeführt. Die Filter werden am nächsten Morgen 3x mit 2×SSC + 0,1 % SDS für jeweils ca. 10 min. gewaschen.

15

Nukleinsäuresequenzen, die von der in SEQ ID No.1 angegebenen Nukleinsäuresequenz abweichen, können z.B. durch Einbringen einer oder mehrerer Nukleotidsubstitutionen, -additionen oder -deletionen in eine Nukleotidsequenz der SEQ ID No. 1 erzeugt werden, so dass Proteine entstehen, in die gegenüber der in

20 SEQ ID No. 2 angegebenen Sequenz eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen,

-additionen oder -deletionen eingebracht wurden. Mutationen können in die Sequenz der SEQ ID No. 1 durch Standardtechniken, wie z.B. stellenspezifische Mutagenese und PCR-vermittelte Mutagenese, eingebracht werden. Vorzugsweise werden konservative Aminosäuresubstitutionen an einem oder mehreren der vorhergesagten nicht-essentiellen Aminosäurereste, also an Aminosäureresten, die die Kinaseaktivität und/oder die LRR-Domäne nicht beeinflussen, hergestellt. Bei einer "konservativen Aminosäuresubstitution" wird ein Aminosäurerest gegen einen Aminosäurerest mit einer ähnlichen Seitenkette ausgetauscht. Im Fachgebiet sind Familien von Aminosäureresten mit ähnlichen Seitenketten definiert worden.

5 Diese Familien umfassen Aminosäuren mit basischen Seitenketten (z.B. Lysin, Arginin, Histidin), sauren Seitenketten (z.B. Asparaginsäure und Glutaminsäure), ungeladenen polaren Seitenketten (z.B. Glycin, Asparagin, Glutamin, Serin, Threonin, Tyrosin, Cystein), unpolaren Seitenketten (z.B. Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin, Phenylalanin, Methionin, Tryptophan), beta-verzweigten

15 Seitenketten (z.B. Threonin, Valin, Isoleucin) und aromatischen Seitenketten (z.B. Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan). Ein vorhergesagter nicht-essentieller Aminosäurerest in dem erfindungsgemäß verwendeten Protein wird somit vorzugsweise durch einen anderen Aminosäurerest aus der gleichen Seitenkettenfamilie ausgetauscht. Alternativ können bei einer anderen

20 Ausführungsform die Mutationen zufallsgemäß über die gesamte oder einen Teil der für das erfindungsgemäße Protein kodierenden Sequenz eingebracht werden, z.B. hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Pathogenresistenz zu vermitteln, durchmustert werden.

Unter dem Begriff "Fragmente der DNA", wie er hier verwendet wird, versteht man

25 Teilstücke der DNA, die für ein erfindungsgemäßes Protein kodieren, dessen biologische Aktivität darin besteht, dass es eine Erhöhung der Pathogenresistenz vermittelt. Bevorzugt kodieren die DNA-Fragmente für ein Protein mit einer Kinase-Aktivität oder mit einer LRR-Domäne, besonders bevorzugt mit beiden Merkmalen,

wobei die von den DNA-Teilstücken kodierten Proteine im wesentlichen die gleiche Kinaseaktivität und/oder die gleiche LRR-Domäne aufweisen wie die von der vollständigen DNA-Sequenz kodierten Proteine und sich mit diesen Fragmenten die erfindungsgemäße Erhöhung der Pathogenresistenz in transgenen Pflanzen erzielen lässt.

Der Begriff "Fragmente des Proteins", wie er hier verwendet wird, bezeichnet Teilstücke des Proteins, dessen biologische Aktivität darin besteht, dass es eine Erhöhung der Pathogenresistenz (bevorzugt der Pilzpathogenresistenz) in Pflanzen vermittelt. Bevorzugt weisen die Fragmente des Proteins eine Kinase-Aktivität oder eine LRR-Domäne auf, besonders bevorzugt beide Merkmale, wobei die Teilstücke des Proteins im wesentlichen die gleiche Kinaseaktivität und/oder die gleiche LRR-Domäne aufweisen wie das Protein in seiner vollen Länge und sich mit diesen Fragmenten die erfindungsgemäße Erhöhung der Pathogenresistenz in transgenen Pflanzen erzielen lässt.

Unter im Wesentlichen gleicher enzymatischer Aktivität des im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Proteins mit Kinaseaktivität ist zu verstehen, dass die enzymatische Aktivität gegenüber den durch die Sequenz mit SEQ ID No. 1 oder deren Derivate kodierten Enzymen im Vergleich noch mindestens 50%, bevorzugt mindestens 60%, besonders bevorzugt mindestens 70%, insbesondere bevorzugt mindestens 80% und am meisten bevorzugt mindestens 90% beträgt. Proteine mit Kinaseaktivität mit im wesentlichen gleicher enzymatischer Aktivität sind damit ebenfalls geeignet, in transgenen Pflanzen eine erhöhte Pathogenresistenz zu bewirken.

Die Kinaseaktivität von Proteinen lässt sich durch einfache Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind und die als Kinase-Assays bezeichnet werden, bestimmen.

Dazu wird z.B. das zu testende Protein, das z.B. durch Immunpräzipitation aufgereinigt wurde, in einem geeigneten Puffer mit radioaktiv markiertem ATP als Phosphatdonor und einem geeigneten Substrat inkubiert und anschließend das Substrat über ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Wenn das Protein eine

5 Kinase-Aktivität aufweist, wird das Substrat mit dem radioaktiv markiertes Phosphat markiert und die Radioaktivität kann mit geeigneten Verfahren nachgewiesen und quantifiziert werden.

Die erfindungsgemäße Erhöhung der Pathogenresistenz kann auch dadurch erreicht

10 werden, dass die Expression des Pflanzen-eigenen endogenen Proteins, welches dem erfindungsgemäßen Protein entspricht, manipuliert wird. Es handelt sich also um ein Pflanzen-eigenes Protein, das eine Erhöhung der Pathogenresistenz vermittelt und das bevorzugt eine Kinaseaktivität oder eine LRR-Domäne und besonders bevorzugt beide Merkmale aufweist. Diese Manipulation der Proteinexpression kann

15 beispielsweise durch eine Veränderung der Promotor-DNA-Sequenz des Proteinkodierenden Gens erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine veränderte, vorzugsweise erhöhte Expressionsrate des endogenen erfindungsgemäßen Gens zur Folge hat, kann durch Deletion oder Insertion von DNA-Sequenzen erfolgen. Eine Veränderung der Promotor-Sequenz von endogenen erfindungsgemäßen Genen führt

20 in der Regel zu einer Veränderung der exprimierten Menge des Gens und damit z.B. auch zu einer Veränderung der in der Zelle bzw. den Pflanzen nachweisbaren Kinase-Aktivität (sofern das Protein eine Kinaseaktivität aufweist). Die Veränderung der Promotor-Sequenz des erfindungsgemäßen endogenen Gens kann auch zu einer Veränderung der Menge an Protein mit einer LRR-Domäne in der Zelle führen.

25 Eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung der Aktivität und des Gehalts des erfindungsgemäßen endogenen Proteins besteht darin, Transkriptionsfaktoren, die in die Transkription des entsprechenden endogenen Genes involviert sind, z.B. durch

Überexpression hochzuregulieren. Die Maßnahmen zur Überexpression von Transkriptionsfaktoren sind dem Fachmann bekannt und werden ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Erfindung für erfindungsgemäße Proteine offenbart.

- 5 Des Weiteren kann eine erhöhte Expression eines endogenen erfindungsgemäßen Gens dadurch erzielt werden, dass ein im nicht-transformierten Organismus nicht vorkommendes Regulatorprotein mit dem Promotor dieser Gene in Wechselwirkung tritt. Bei einem solchen Regulator kann es sich um ein chimäres Protein handeln, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne  
10 besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

“Transgen” meint zum Beispiel bezüglich einer Nukleinsäuresequenz, einer Expressionskassette oder einem Vektor enthaltend besagte Nukleinsäuresequenz oder einem Organismus transformiert mit besagter Nukleinsäuresequenz,

- 15 Expressionskassette oder Vektor, alle solche durch gentechnische Methoden zustande gekommenen Konstruktionen oder Organismen, in denen sich entweder

a) die RNR8-Nukleinsäuresequenz, oder

- 20 b) eine mit der RNR8-Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpfte genetische Kontrollsequenz, zum Beispiel ein Promotor, oder

c) (a) und (b)

- 25 nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielhaft eine Substitution, Addition, Deletion, oder Insertion eines oder mehrerer Nukleotide sein kann.

"Natürliche genetische Umgebung" meint den natürlichen chromosomalen Locus in

dem Herkunftsorganismus oder das Vorliegen in einer genomischen Bibliothek. Im Fall einer genomischen Bibliothek ist die natürliche, genetische Umgebung der Nukleinsäuresequenz bevorzugt zumindest noch teilweise erhalten. Die Umgebung flankiert die Nukleinsäuresequenz zumindest an einer Seite und hat eine

5 Sequenzlänge von mindestens 50 bp, bevorzugt mindestens 500 bp, besonders bevorzugt mindestens 1000 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 5000 bp. Eine natürlich vorkommende Expressionskassette - beispielsweise die natürlich vorkommende Kombination des RNR8-Promotors mit dem entsprechenden RNR8-Gen - wird zu einer transgenen Expressionskassette, wenn diese durch nicht-

10 natürliche, synthetische ("künstliche") Verfahren wie beispielsweise eine Mutagenisierung verändert wird. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (US 5,565,350; WO 00/15815).

"Einführung" umfasst im Rahmen der Erfindung alle Verfahren, die dazu geeignet

15 sind, eine RNR8-Nukleinsäuresequenz, direkt oder indirekt, in eine Pflanze oder eine Zelle, Kompartiment, Gewebe, Organ oder Samen derselben einzuführen oder dort zu generieren. Die Einführung kann zu einer vorübergehenden (transienten) oder zu einer dauerhaften (stabilen) Präsenz einer RNR8-Nukleinsäuresequenz führen.

20 „Einführung“ umfasst beispielsweise Verfahren wie Transfektion, Transduktion oder Transformation.

Die Einbringung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette in einen Organismus oder Zellen, Gewebe, Organe, Teile bzw. Samen desselben (bevorzugt in Pflanzen

25 bzw. pflanzliche Zellen, Gewebe, Organe, Teile oder Samen), kann vorteilhaft unter Verwendung von Vektoren realisiert werden, in denen die Expressionskassetten enthalten sind. Die Expressionskassette kann in den Vektor (zum Beispiel ein Plasmid) über eine geeignete Restriktionsschnittstelle eingeführt werden. Das

entstandene Plasmid wird zunächst in *E.coli*-Zellen eingeführt. Korrekt transformierte *E.coli*-Zellen werden selektioniert, gezüchtet und das rekombinante Plasmid mit dem Fachmann geläufigen Methoden gewonnen. Restriktionsanalyse und Sequenzierung können dazu dienen, den Klonierungsschritt zu überprüfen.

5

Bei den Vektoren kann es sich beispielsweise um Plasmide, Cosmide, Phagen, Viren oder auch Agrobakterien handeln. In einer vorteilhaften Ausführungsform wird die Einführung der Expressionskassette mittels Plasmidvektoren realisiert. Bevorzugt sind solche Vektoren, die eine stabile Integration der Expressionskassette in das

10 Wirtsgenom ermöglichen.

Die Herstellung eines transformierten Organismus (bzw. einer transformierten Zelle) erfordert, dass das entsprechende DNA-Moleküle in die entsprechende Wirtszelle eingebracht wird und anschließend durch die Genexpression die

15 entsprechenden RNAs und Proteine gebildet werden.

Für diesen Vorgang, der als Transformation (oder Transduktion bzw. Transfektion) bezeichnet wird, steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung (Keown et al. (1990) *Methods in Enzymology* 185: 527-537). So kann die DNA oder RNA

20 beispielhaft direkt durch Mikroinjektion oder durch Bombardierung mit DNA-beschichteten Mikropartikeln eingeführt werden. Auch kann die Zelle chemisch, zum Beispiel mit Polyethylenglykol, permeabilisiert werden, so dass die DNA durch Diffusion in die Zelle gelangen kann. Die DNA kann auch durch Protoplastenfusion mit anderen DNA-enthaltenden Einheiten wie Minicells, Zellen, Lysosomen oder

25 Liposomen in die Zelle eingeführt werden. Elektroporation ist eine weitere geeignete Methode zur Einführung von DNA, bei der die Zellen reversibel durch einen elektrischen Impuls permeabilisiert werden. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (beispielsweise bei Bilanz et al. (1991) *Gene* 100: 247-250; Scheid et al.

(1991) Mol. Gen. Genet. 228: 104-112; Guerche et al. (1987) Plant Science 52: 111-116; Neuhauser et al. (1987) Theor. Appl. Genet. 75: 30-36; Klein et al. (1987) Nature 327: 70-73 ; Howell et al. (1980) Science 208: 1265; Horsch et al. (1985) Science 227: 1229-1231 ; DeBlock et al. (1989) Plant Physiology 91: 694-701;  
5 Methods for Plant Molecular Biology (Weissbach and Weissbach, eds.) Academic Press Inc. (1988); and Methods in Plant Molecular Biology (Schuler and Zielinski, eds.) Academic Press Inc. (1989)).

Bei Pflanzen werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und  
10 Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind vor allem die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone, die sogenannte "particle bombardment" Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger  
15 Lösung und die Mikroinjektion.

Neben diesen "direkten" Transformationstechniken kann eine Transformation auch durch bakterielle Infektion mittels *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* durchgeführt werden. Die Verfahren sind beispielsweise beschrieben bei  
20 Horsch et al. (1985) Science 225: 1229f.

Werden Agrobakterien verwendet, so ist die Expressionskassette in spezielle Plasmide zu integrieren, bei denen es sich entweder um einen Zwischenvektor (englisch: shuttle or intermediate vector) oder um einen binären Vektor handeln  
25 kann. Wird ein Ti- oder Ri-Plasmid zur Transformation verwendet, ist zumindest die rechte Begrenzung, meistens jedoch sowohl die rechte als auch die linke Begrenzung der Ti- oder Ri-Plasmid-T-DNA als flankierende Region mit der einzuführenden Expressionskassette verbunden.

Bevorzugt werden binäre Vektoren verwendet. Binäre Vektoren können sowohl in *E.coli* als auch in *Agrobacterium* replizieren. Sie enthalten in der Regel ein Selektionsmarkergen und einen Linker oder Polylinker flankiert von der rechten und linken T-DNA-Begrenzungssequenz. Sie können direkt in *Agrobacterium*

5 transformiert werden (Holsters et al. (1978) Mol. Gen. Genet. 163: 181-187). Das Selektionsmarkergen, zum Beispiel das nptII Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin verleiht, erlaubt eine Selektion transformierter *Agrobacterien*. Das in diesem Fall als Wirtsorganismus fungierende *Agrobacterium* sollte bereits ein Helfer-Ti-Plasmid mit der vir-Region enthalten, die für die Übertragung der T-DNA

10 auf die pflanzliche Zelle erforderlich ist. Ein so transformiertes *Agrobacterium* kann zur Transformation pflanzlicher Zellen verwendet werden. Die Verwendung von T-DNA zur Transformation pflanzlicher Zellen ist intensiv untersucht und beschrieben (EP 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam, Chapter V; An et al. (1985) EMBO J 4: 277-287). Verschiedene

15 binäre Vektoren sind bekannt und teilweise kommerziell erhältlich wie zum Beispiel pBI101.2 oder pBIN19 (Clontech Laboratories, Inc. USA).

Im Falle der Injektion oder Elektroporation von DNA bzw. RNA in pflanzliche Zellen werden keine besonderen Anforderungen an das verwendete Plasmid gestellt.

20 Einfache Plasmide wie die der pUC-Reihe können verwendet werden. Sollen aus den transformierten Zellen vollständige Pflanzen regeneriert werden, so ist erforderlich, das sich auf dem Plasmid ein zusätzliches selektionierbares Markergen befindet.

25 Stabil transformierte Zellen, d.h. solche, die die eingeführte DNA integriert in die DNA der Wirtszelle enthalten, können von untransformierten unterschieden werden, wenn ein selektionierbarer Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5: 81-84). Als Marker kann beispielhaft

jedes Gen fungieren, dass eine Resistenz gegen Antibiotika oder Herbizide (wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin) zu verleihen vermag. Transformierte Zellen, die ein solches Markergen exprimieren, sind in der Lage, in der Gegenwart von Konzentrationen eines entsprechenden Antibiotikums oder Herbizides zu überleben, die einen untransformierten Wildtyp abtöten. Beispiele 5 umfassen das bar-Gen, das Resistenz gegen das Herbizid Phosphinotricin verleiht (Rathore et al. (1993) Plant Mol Biol 21(5): 871-884), das nptII-Gen, das Resistenz gegen Kanamycin verleiht, das hpt-Gen, das Resistenz gegen Hygromycin verleiht, oder das EPSP-Gen, das Resistenz gegen das Herbizid Glyphosat verleiht. Die 10 erhaltenen Pflanzen können in üblicher Weise gezüchtet und gekreuzt werden. Es sollten zwei oder mehr Generationen kultiviert werden, um sicherzustellen, dass die genomische Integration stabil und vererblich ist.

Die oben genannten Verfahren sind beispielsweise beschrieben in Jenes et al. (1993) 15 Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von SD Kung und R Wu, Academic Press, S. 128-143 sowie in Potrykus (1991) Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42: 205-225). Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise in pBin19 20 (Bevan et al. (1984) Nucl. Acids Res. 12: 8711f).

Sobald eine transformierte Pflanzenzelle hergestellt wurde, kann eine vollständige Pflanze unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren erhalten werden. Hierbei geht man beispielhaft von Kalluskulturen aus. Aus diesen noch 25 undifferenzierten Zellmassen kann die Bildung von Spross und Wurzel in bekannter Weise induziert werden. Die erhaltenen Sprösslinge können ausgepflanzt und gezüchtet werden.

Dem Fachmann sind auch Verfahren bekannt, um aus Pflanzenzellen Pflanzenteile und ganze Pflanzen zu regenerieren. Beispielsweise werden hierzu Verfahren beschrieben von Fennell et al. (1992) Plant Cell Rep. 11: 567-570; Stoeger et al (1995) Plant Cell Rep. 14: 273-278; Jahne et al. (1994) Theor. Appl. Genet. 89: 525-533 verwendet.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül, umfassend die folgenden Elemente in 5'-3'-Orientierung:

- 10 - regulatorische Sequenzen eines in Pflanzenzellen aktiven Promotors,  
- operativ daran gebunden eine erfindungsgemäße DNA-Sequenz,  
- ggf. operativ daran gebunden regulatorische Sequenzen, die in der Pflanzenzelle als Transkriptions-, Terminations- und/oder Polyadenylierungssignale dienen können.
- 15 "Operativ daran gebunden" bedeutet, dass ein Promotor und die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz und ggf. weitere regulatorische Elemente derart angeordnet sind, dass jedes der regulatorischen Elemente seine Funktion bei der Expression der Nukleinsäuresequenz ausüben kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie  
20 zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter der als Promotor fungierenden Sequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist  
25 dabei der Abstand zwischen der Promotorsequenz und der transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare und am meisten bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.

Die Herstellung einer operativen Verknüpfung und die Herstellung eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken erfolgen, wie sie beispielsweise in Sambrook und Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Silhavy TJ, Berman ML und Enquist LW (1984) *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Ausubel FM et al. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience und bei Gelvin et al. (1990) In: *Plant Molecular Biology Manual* beschrieben sind. Zwischen Promotor und der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz können aber auch weitere Sequenzen positioniert werden, die zum Beispiel die Funktion eines Linkers mit bestimmten Restriktionsenzymchnittstellen oder eines Signalpeptides haben. Auch kann die Insertion von Sequenzen zur Expression von Fusionsproteinen führen. Bevorzugt kann das rekombinante Nukleinsäuremolekül, mindestens umfassend einen Promotor und die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz in operativer Verknüpfung, integriert in einem Vektor vorliegen und durch zum Beispiel Transformation in ein pflanzliches Genom inseriert werden.

Pflanzenspezifische Promotoren meint grundsätzlich jeden Promotor, der die Expression von Genen, insbesondere Fremdgenen, in Pflanzen oder Pflanzenteilen, -zellen, -geweben, -kulturen steuern kann. Dabei kann die Expression beispielsweise konstitutiv, induzierbar oder entwicklungsabhängig sein.

Bevorzugt sind:

25

a) Konstitutive Promotoren

- “Konstitutiver” Promotor meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV (Blumenkohlmosaikvirus) (Franck et al. (1980) Cell 21: 285-294; Odell et al. (1985) Nature 313: 810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140: 281-288; Gardner et al. (1986) Plant Mol. Biol. 6: 221- 228) oder der 19S CaMV-Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J. 8: 2195-2202). Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der “Rubisco small subunit (SSU)”-Promotor (US 4,962,028), der Promotor der Nopalinsynthase aus *Agrobacterium*, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase)-Promotor aus *Agrobacterium*, der Ubiquitin-Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29: 637-649), der Ubiquitin 1-Promotor (Christensen et al. (1992) Plant Mol Biol 18: 675-689; Bruce et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9692-9696), der Smas-Promotor, der Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolärer ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist. Als konstitutiver Promotor insbesondere bevorzugt ist der Promotor des Nitrilase-1 (nit1) Gens aus *A. thaliana* (GenBank Acc.-No.: Y07648.2, Nukleotide 2456-4340, Hillebrand et al. (1996) Gene 170:197-200).
- b) Gewebespezifische Promotoren

In einer Ausführungsform werden Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Blüten, Blätter, Stengel, Wurzeln und Samen verwendet.

Samenspezifische Promotoren sind zum Beispiel der Promotor des Phaseolins (US 5,504,200; Bustos et al. (1989) *Plant Cell* 1(9): 839-53), des 2S-Albumingens (Joseffson et al. (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 12196-12201), des Legumins (Shirsat et al. (1989) *Mol. Gen. Genet.* 215(2): 326-331), des USP (unknown seed protein; Bäumlein et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 225(3): 459-67), des Napin-Gens (US 5,608,152; Stalberg et al. (1996) *L. Planta* 199: 515-519), des Gens kodierend für das Saccharosebindeprotein (WO 00/26388) oder der Legumin B4-Promotor (LeB4; Bäumlein et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 225: 121-128; Bäumlein et al. (1992) *Plant Journal* 2(2): 233-9; Fiedler et al. (1995) *Biotechnology (NY)* 13(10): 1090f), der Oleosin-Promotor aus *Arabidopsis* (WO 98/45461), der Bce4-Promotor aus *Brassica* (WO 91/13980). Weitere geeignete samenspezifische Promotoren sind die der Gene kodierend für das "High Molecular Weight Glutenin" (HMWG), Gliadin, Verzweigungsenzym, ADP-Glucose-Pyrophosphatase (AGPase) oder die Stärkesynthase. Bevorzugt sind ferner Promotoren, die eine samenspezifische Expression in Monokotyledonen wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis etc. erlauben. Vorteilhaft eingesetzt werden können der Promotor des lpt2- oder des lpt1-Gens (WO 95/15389, WO 95/23230) oder die in WO 99/16890 beschriebenen Promotoren (Promotoren des Hordein-Gens, des Glutelin-Gens, des Oryzin-Gens, des Prolamin-Gens, des Gliadin-Gens, des Zein-Gens, des Kasirin-Gens oder des Secalin-Gens).

Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren sind beispielsweise der Patatin-Promotor Klasse I (B33) und der Promotor des Cathepsin D-Inhibitors aus Kartoffel.

Blattspezifische Promotoren sind beispielsweise der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase) oder der ST-LSI Promotor aus

Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) EMBO J. 8: 2445-2451). Epidermis-spezifische Promotoren sind beispielsweise der Promotor des OXLP-Gens ("Oxalat-Oxidase like protein"; Wei et al. (1998) Plant Mol. Biol. 36: 101-112), ein Promotor bestehend aus dem GSTA1-Promotor und dem WIR1a-Intron

5 (WO 2005/035766) und der GLP4-Promotor (PCT/EP 2006/062747).

Andere gewebespezifische Promotoren sind z.B. blütenspezifische Promotoren wie beispielsweise der Phytoen-Synthase-Promotor (WO 92/16635) oder der Promotor des Prr-Gens (WO 98/22593) und Antheren-spezifische Promotoren wie der 5126-  
10 Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), der globl-Promotor und der  $\gamma$ -Zein Promotor.

c) Chemisch induzierbare Promotoren

15 Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48: 89-108), durch den die Expression des exogenen Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol. Biol. 22: 361-366), ein durch  
20 Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J. 2: 397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol oder Cyclohexanon induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls verwendet werden.

25

## d) Stress- oder Pathogen-induzierbare Promotoren

Ganz besonders vorteilhaft ist die Verwendung von pathogen-induzierbaren Promotoren, da diese eine Expression nur im Bedarfsfall (d.h. Pathogenbefall) ermöglichen.

Im erfindungsgemäßen Verfahren werden daher in einer Ausführungsform in Pflanzen aktive Promotoren verwendet, bei denen es sich Pathogen-induzierbare Promotor handelt.

10

Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die Promotoren von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden, wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen,  $\beta$ -1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth. J. Plant Pathol. 89: 245-254; Uknes et al. (1992) Plant Cell 4: 645-656; Van Loon (1985) Plant Mol. Virol. 4: 111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol. Biol. 9: 335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2: 325-342; Somssich et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol. Gen. Genetics 2: 93-98; Chen et al. (1996) Plant J. 10: 955-966; Zhang and Sing (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2507-2511; Warner et al. (1993) Plant J. 3: 191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1: 961-968).

20

Umfasst sind auch durch Verwundung induzierbare Promotoren wie der des pinII-Gens (Ryan (1990) Ann. Rev. Phytopath. 28: 425-449; Duan et al. (1996) Nat. Biotech. 14: 494-498), des wun1- und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) Mol. Gen. Genet. 215: 200-208), des Systemin-Gens (McGurl et al. (1992) Science 225: 1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol. Biol. 22: 783-792; Eckelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:

25

73-76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) Plant J. 6(2): 141-150) und dergleichen.

- Eine Quelle für weitere pathogen-induzierbare Promotoren stellt die PR-Genfamilie dar. Eine Reihe von Elementen in diesen Promotoren haben sich als vorteilhaft erwiesen. So vermittelt der Nukleotidbereich von Nukleotid -364 bis Nukleotid -288 im Promotor von PR-2d Salicylat-Spezifität (Buchel et al. (1996) Plant Mol. Biol. 30: 493-504). Die Sequenz 5'-TCATCTTCTT-3' taucht im Promotor der Gersten  $\beta$ -1,3-Glucanase und in mehr als 30 weiteren stress-induzierten Genen wiederholt auf.
- 10 Diese Region bindet in Tabak ein nukleäres Protein, dessen Menge durch Salicylat erhöht wird. Die PR-1-Promotoren aus Tabak und Arabidopsis (EP-A 0 332 104, WO 98/03536) eignen sich ebenfalls als pathogen-induzierbare Promotoren. Bevorzugt, da besonders spezifisch durch Pathogen induziert, sind die "acidic PR-5"- (aPR5)-Promotoren aus Gerste (Schweizer et al. (1997) Plant Physiol. 114: 79-88) und Weizen (Rebmann et al. (1991) Plant Mol. Biol. 16: 329-331). aPR5-Proteine akkumulieren in ca. 4 bis 6 Stunden nach Pathogenbefall und zeigen nur eine sehr geringe Hintergrundexpression (WO 99/66057). Ein Ansatz, um eine erhöhte pathogen-induzierte Spezifität zu erreichen, bildet die Herstellung synthetischer Promotoren aus Kombinationen von bekannten pathogen-responsiven
- 20 Elementen (Rushton et al. (2002) Plant Cell 14: 749-762; WO 00/01830; WO 99/66057). Weitere pathogen-induzierbare Promotoren aus verschiedenen Arten sind dem Fachmann bekannt (EP-A 1 165 794; EP-A 1 062 356; EP-A 1 041 148; EP-A 1 032 684).
- 25 Weitere pathogen-induzierbare Promotoren umfassen den Flachs *FisI*-Promotor (WO 96/34949), den Vst1-Promotor (Schubert et al. (1997) Plant Mol. Biol. 34: 417-426) sowie den EAS4 Sesquiterpen-Cyclase-Promotor aus Tabak (US 6,100,451).

Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden, wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (bzw. *gstI* Promotor) z.B. aus Kartoffel (WO 96/28561; Ward et al. (1993) Plant Mol. Biol. 22: 361-366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder hsp80-Promotor aus  
5 Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase-Promotor aus der Kartoffel (WO 96/12814), der licht-induzierbare PPKK-Promotor oder der verwundungsinduzierte pinII-Promotor (EP-A 0 375 091).

e) Mesophyllgewebe-spezifische Promotoren

10

„Mesophyllgewebe“ meint das zwischen den Epidermisschichten liegende Blattgewebe, bestehend aus dem Palisadengewebe, dem Schwammgewebe und den Blattadern.

15 Im erfindungsgemäßen Verfahren werden in einer Ausführungsform Mesophyllgewebe-spezifische Promotoren wie beispielsweise der Promotor des Weizen Germin 9f-3.8 Gens (GenBank Acc.-No.: M63224) oder der Gerste GerA-Promotor (WO 02/057412) verwendet. Besagte Promotoren sind besonders vorteilhaft, da sie sowohl Mesophyllgewebe-spezifisch als auch pathogen-  
20 induzierbar sind. Ferner geeignet ist der Mesophyllgewebe-spezifische Arabidopsis CAB-2 Promotor (GenBank Acc.-No.: X15222), sowie der *Zea mays* PPCZm1-Promotor (GenBank Acc.-No.: X63869) oder Homologe davon. Mesophyllgewebe-spezifisch meint eine durch die spezifische Wechselwirkung von in der Promotorsequenz vorhandenen Cis-Elementen und an diese bindende  
25 Transkriptionsfaktoren hervorgerufene Beschränkung der Transkription eines Gens auf möglichst wenige, das Mesophyllgewebe enthaltende Pflanzengewebe, vorzugsweise ist eine auf das Mesophyllgewebe beschränkte Transkription gemeint.

- Weitere Mesophyll-spezifische Promotoren sind PPCZm1 (=PEPC; Kausch (2001) Plant Mol. Biol. 45: 1-15); OsrbcS (Kyojuka et al. (1993) Plant Phys. 102: 991-1000); OsPPDK, acc. AC099041; TaGF-2.8, acc. M63223 (Schweizer (1999) Plant J. 20: 541-552); TaFBPase, acc. X53957; TaWIS1, acc. AF467542
- 5 (US 2002/115849); HvBIS1, acc. AF467539 (US 2002/115849); ZmMIS1, acc. AF467514 (US 2002/115849); HvPR1a, acc. X74939 (Bryngelsson et al. (1994) Molecular Plant-Microbe Interactions 7(2): 267-75; HvPR1b, acc. X74940 (Bryngelsson et al. (1994) Molecular Plant-Microbe Interactions 7(2): 267-75); HvB1,3gluc; acc. AF479647; HvPrx8, acc. AJ276227 (Kristensen et al (2001) Molecular Plant Pathology 2(6): 311-317; und HvPAL, acc. X97313 (Wei (1998) Plant Molecular Biology 36: 101-112).

#### f) Epidermis-spezifische Promotoren

- 15 „Epidermisgewebe“ oder Epidermis meint die äußeren Gewebeschichten der Pflanzen. Die Epidermis kann ein- bis mehrschichtig sein; es gibt epidermis-„angereicherte“ Genexpression, wie z.B. von Cer3 , die als Marker dienen kann (Hannoufa. (1996) Plant J. 10 (3): 459-467).
- 20 Unter „Epidermis“ versteht der Fachmann vorzugsweise das vorherrschende Abschlussgewebe primärer oberirdischer Pflanzenteile, z.B. des Sprosses, der Blätter, Blüten, Früchte und Samen.

- Epidermisspezifische Promotoren sind beispielsweise WIR5 (=GstA1), acc. X56012
- 25 (Dudler & Schweizer, unveröff.); GLP4, acc. AJ310534 (Wei (1998) Plant Molecular Biology 36: 101-112); GLP2a, acc. AJ237942 (Schweizer (1999). Plant J 20: 541-552); Prx7, acc. AJ003141 (Kristensen (2001) Molecular Plant Pathology 2(6): 311-317); GerA, acc. AF250933 (Wu (2000) Plant Phys. Biochem. 38: 685-

698); OsROC1, acc. AP004656; RTBV, acc. AAV62708, AAV62707 (Klöti (1999) PMB 40: 249-266) und Cer3 (Hannoufa (1996) Plant J. 10 (3): 459-467).

g) Entwicklungsabhängige Promotoren

5

Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise fruchtreifungs-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifungs-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließen zum Teil die gewebespezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.

10

Besonders bevorzugt sind konstitutive, sowie Blatt- und/oder Stengel-spezifische, pathogen-induzierbare, Wurzel-spezifische, Mesophyllgewebe-spezifische Promotoren, wobei konstitutive, pathogen-induzierbare, Mesophyllgewebe-spezifische und Wurzel-spezifische Promotoren am meisten bevorzugt sind.

15

Es können ferner weitere Promotoren operativ mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz verknüpft sein, die eine Expression in weiteren Pflanzengeweben oder in anderen Organismen, wie zum Beispiel *E.coli*-Bakterien ermöglichen. Als Pflanzen Promotoren kommen im Prinzip alle oben beschriebenen Promotoren in Frage.

20

Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind beschrieben (Rogers et al. (1987) Meth. in Enzymol. 153: 253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61: 1-11; Berger et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8402-8406).

25

Darüber hinaus ist der Durchschnittsfachmann in der Lage, mittels Routinemethoden weitere geeignete Promotoren zu isolieren. So kann der Fachmann mit Hilfe gängiger

molekularbiologischer Methoden, z.B. Hybridisierungsexperimenten oder DNA-Protein-Bindungsstudien z. B. weitere epidermis-spezifische regulatorische Nukleinsäureelemente identifizieren. Dabei wird z.B. in einem ersten Schritt das gewünschte Gewebe aus dem gewünschten Organismus, aus dem die regulatorischen

5 Sequenzen isoliert werden sollen, isoliert und daraus die gesamte poly(A)<sup>+</sup>-RNA isoliert und eine cDNA-Bank angelegt. In einem zweiten Schritt werden mit Hilfe von cDNA-Klonen, die auf poly(A)<sup>+</sup>-RNA-Molekülen aus einem anderen Gewebe basieren, aus der ersten Bank mittels Hybridisierung diejenigen Klone identifiziert, deren korrespondierende poly(A)<sup>+</sup>-RNA-Moleküle lediglich im gewünschten

10 Gewebe akkumulieren. Anschließend werden mit Hilfe dieser so identifizierten cDNAs Promotoren isoliert, die über Gewebe-spezifische regulatorische Elemente verfügen. Dem Fachmann stehen darüber hinaus weitere auf PCR basierende Methoden für die Isolierung geeigneter Gewebe-spezifischer Promotoren zur Verfügung.

15

Die in den erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder Vektoren enthaltenen Nukleinsäuresequenzen können mit weiteren genetischen Kontrollsequenzen neben einem Promotor operativ verknüpft sein. Der Begriff der genetischen

20 Kontrollsequenzen ist breit zu verstehen und meint all solche Sequenzen, die einen Einfluss auf das Zustandekommen oder die Funktion des erfindungsgemäßen rekombinanten Nukleinsäuremoleküls haben. Genetische Kontrollsequenzen modifizieren zum Beispiel die Transkription und Translation in prokaryotischen oder eukaryotischen Organismen. Vorzugsweise umfassen die erfindungsgemäßen Expressionskassetten 5'-stromaufwärts von der jeweiligen transgen zu

25 exprimierenden Nukleinsäuresequenz einen Promotor mit einer vorab beschriebenen Spezifität und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz als zusätzliche genetische Kontrollsequenz, sowie gegebenenfalls weitere übliche

regulative Elemente, und zwar jeweils funktionell verknüpft mit der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren,

- 5 Promotorelemente oder Minimalpromotoren, die die expressionssteuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die gewebespezifische Expression zusätzlich abhängig von bestimmten Stressfaktoren erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wasserstress, Abscisinsäure (Lam E und Chua NH (1991) J. Biol. Chem. 266(26): 17131 -17135)  
10 und Hitzestress (Schoffl F et al. (1989) Mol. Gen. Genet. 217(2-3): 246-53) beschrieben.

Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen wie die oben genannten für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden.

- 15 Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierten Regionen, Introns oder die nicht-kodierende 3'-Region von Genen wie beispielsweise das Actin-1 Intron, oder die Adh1-S Introns 1, 2 und 6 (allgemein: The Maize  
20 Handbook, Chapter 116, Freeling and Walbot, Eds., Springer, New York (1994)). Es ist gezeigt worden, dass diese eine signifikante Rolle bei der Regulation der Genexpression spielen können. So wurde gezeigt, dass 5'-untranslatierte Sequenzen die transiente Expression heterologer Gene verstärken können. Beispielhaft für Translationsverstärker sei die 5'-Leadersequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus zu  
25 nennen (Gallie et al. (1987) Nucl. Acids Res. 15: 8693-8711) und dergleichen. Sie können ferner die Gewebespezifität fördern (Rouster J et al. (1998) Plant J. 15: 435-440).

Das rekombinante Nukleinsäuremolekül kann vorteilhafterweise eine oder mehrere sogenannte "enhancer"-Sequenzen funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte transgene Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der transgen zu exprimierenden

5 Nukleinsäuresequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

10 Als Kontrollsequenzen geeignete Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA Polyadenylierungssignalen aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACHS entsprechen (Gielen et al. (1984) EMBO J. 3: 835 ff) oder funktionelle Äquivalente davon. Beispiele für  
15 besonders geeignete Terminatorsequenzen sind der OCS (Octopin-Synthase)-Terminator und der NOS (Nopalin-Synthase)-Terminator.

Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen  
20 oder die Entfernung aus dem Genom erlauben. Bei der homologen Rekombination kann zum Beispiel der natürliche Promotor eines bestimmten Gens gegen einen Promotor mit Spezifität für die embryonale Epidermis und/oder die Blüte ausgetauscht werden.

25 Ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül und ein von ihr abgeleiteter Vektor können weitere Funktionselemente enthalten. Der Begriff Funktionselement ist breit zu verstehen und meint all solche Elemente, die einen Einfluss auf Herstellung, Vermehrung oder Funktion der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle, Vektoren

oder transgenen Organismen haben. Beispielfhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen:

- a) Selektionsmarker, die eine Resistenz gegen einen Metabolismusinhibitor wie 2-  
5 Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456), Antibiotika oder Biozide,  
bevorzugt Herbizide, wie zum Beispiel Kanamycin, G 418, Bleomycin,  
Hygromycin, oder Phosphinotricin verleihen. Besonders bevorzugte  
Selektionsmarker sind solche, die eine Resistenz gegen Herbizide verleihen.  
Beispielfhaft seien genannt: DNA-Sequenzen, die für  
10 Phosphinothricinacetyltransferasen (PAT) kodieren und Glutaminsynthase-  
inhibitoren inaktivieren (bar und pat Gen), 5-Enolpyruvylshikimat-3-  
phosphatsynthasegene (EPSP-Synthasegene), die eine Resistenz gegen  
Glyphosat<sup>®</sup> (N-(phosphonomethyl)glycin) verleihen, das für Glyphosat<sup>®</sup>  
degradierende Enzyme kodierende gox-Gen (Glyphosatoxidoreduktase), das  
15 deh-Gen (kodierend für eine Dehalogenase, die Dalapon inaktiviert),  
Sulfonylharnstoff- und Imidazolinon inaktivierende Acetolactatsynthasen sowie  
bxn-Gene, die für Bromoxynil degradierende Nitrilaseenzyme kodieren, das  
aasa-Gen, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Apectinomycin  
verleiht, das Streptomycinphosphotransferase (SPT)-Gen, das eine Resistenz  
20 gegen Streptomycin vermittelt, das Neomycinphosphotransferase (NPTII)-Gen,  
das eine Resistenz gegen Kanamycin oder Geneticidin verleiht, das  
Hygromycinphosphotransferase (HPT)-Gen, das eine Resistenz gegen  
Hygromycin vermittelt, das Acetolactatsynthase-Gen (ALS), das eine Resistenz  
gegen Sulfonylharnstoff-Herbizide verleiht (z.B. mutierte ALS-Varianten mit  
25 z.B. der S4 und/oder Hra Mutation).
- b) Reportergene, die für leicht quantifizierbare Proteine kodieren und über  
Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine Bewertung der Transformationseffizienz

- oder des Expressionsortes oder -zeitpunktes gewährleisten. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn und Groskreutz (1999) Mol. Biotechnol. 13(1): 29-44) wie das "green fluorescence protein" (GFP) (Sheen et al. (1995) Plant Journal 8(5): 777-784; Haseloff et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94(6): 2122-2127; Reichel et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(12): 5888-5893; Tian et al. (1997) Plant Cell Rep. 16: 267-271; WO 97/41228; Chui et al. (1996) Curr Biol 6: 325-330; Leffel et al. (1997) Biotechniques 23(5): 912-8), die Chloramphenicoltransferase, eine Luziferase (Ow et al. (1986) Science 234: 856-859; Millar et al. (1992) Plant Mol. Biol. Rep. 10: 324-414), das Aequorin (Prasher et al. (1985) Biochem. Biophys. Res. Commun. 126(3): 1259-1268), die  $\beta$ -Galaktosidase, R-Locus Gen (kodiert ein Protein, das die Produktion von Anthocyaninpigmenten (rote Färbung) in pflanzlichen Gewebe reguliert und so eine direkte Analyse der Promotoraktivität ohne Zugabe zusätzlicher Hilfsstoffe oder chromogener Substrate ermöglicht; Dellaporta et al., In: Chromosome Structure and Function: Impact of New Concepts, 18th Stadler Genetics Symposium, 11:263-282, 1988), ganz besonders bevorzugt ist die  $\beta$ -Glukuronidase (Jefferson et al. (1987) EMBO J. 6: 3901-3907).
- 5
- 10
- 15
- 20 c) Replikationsursprünge, die eine Vermehrung der erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder Vektoren in zum Beispiel *E.coli* gewährleisten. Beispielhaft seien genannt ORI (origin of DNA replication), der pBR322 ori oder der P15A ori (Sambrook und Russell, *vide supra*).
- 25 d) Elemente, die für eine Agrobakterium-vermittelte Pflanzentransformation erforderlich sind, wie zum Beispiel die rechte oder linke Begrenzung der T-DNA oder die vir-Region.

Zur Selektion erfolgreich transformierter Zellen ist es in der Regel erforderlich, einen selektionierbaren Marker zusätzlich einzuführen, der den erfolgreich transformierten Zellen eine Resistenz gegen ein Biozid (zum Beispiel ein Herbizid), einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456) oder ein  
5 Antibiotikum verleiht. und damit die Selektion der transformierten Zellen gegenüber untransformierten erlaubt (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5: 81-84).

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin transgene Pflanzenzellen und transgene Pflanzen, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder ein  
10 erfindungsgemäßes rekombinantes Nukleinsäuremolekül umfassen, sowie Teile der Pflanzen, transgene Ernteprodukte und transgenes Vermehrungsmaterial dieser Pflanzen, wie Protoplasten, Pflanzenzellen, Kalli, Samen, Knollen, Stecklinge, sowie die transgenen Nachkommen dieser Pflanze.

15 Bevorzugt handelt es sich dabei um Pflanzen, die zu der Familie der Poaceae gehören, besonders bevorzugt sind Pflanzen ausgewählt aus den Pflanzengattungen *Hordeum*, *Avena*, *Secale*, *Triticum*, *Sorghum*, *Zea*, *Saccharum* und *Oryza*, ganz besonders bevorzugt Pflanzen ausgewählt aus den Arten *Hordeum vulgare* (Gerste), *Triticum aestivum* (Weizen), *Triticum aestivum subsp.spelta* (Dinkel), *Triticale*,  
20 *Avena sativa* (Hafer), *Secale cereale* (Roggen), *Sorghum bicolor* (Hirse), *Zea mays* (Mais), *Saccharum officinarum* (Zuckerrohr) und *Oryza sativa* (Reis).

Das Verfahren gemäß vorliegender Erfindung eignet sich aber auch für dikotyle Nutzpflanzen wie beispielsweise Baumwolle, Leguminosen wie Hülsenfrüchte und  
25 insbesondere Alfalfa, Sojabohne, Raps, Tomate, Zuckerrübe, Kartoffel, Sonnenblume, Zierpflanzen sowie Bäume. Weitere Nutzpflanzen können Obst (insbesondere Äpfel, Birnen, Kirschen, Weintrauben, Citrus, Ananas und Bananen), Ölpalmen, Tee-, Kakao- und Kaffeesträucher, Tabak, Sisal sowie bei Heilpflanzen

Rauwolfia und Digitalis umfassen. Besonders bevorzugt sind die dikotylen Pflanzen Zuckerrübe, Raps, Soja, Tomate, Kartoffel und Tabak. Weitere Nutzpflanzen können dem US-Patent Nr. 6,137,030 entnommen werden.

- 5 Die spezifische Expression des erfindungsgemäßen Proteins in den erfindungsgemäßen Pflanzen bzw. in den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen kann mit Hilfe herkömmlicher molekularbiologischer und biochemischer Methoden nachgewiesen und verfolgt werden. Dem Fachmann sind diese Techniken bekannt und er ist problemlos in der Lage, eine geeignete Nachweismethode zu wählen,
- 10 beispielsweise eine Northern-Blot-Analyse zum Nachweis Protein-spezifischer RNA bzw. zur Bestimmung der Höhe der Akkumulation von Protein-spezifischer RNA oder eine Southern-Blot- bzw. PCR-Analyse zum Nachweis von für ein erfindungsgemäßes Protein kodierenden DNA-Sequenzen. Die dazu verwendeten Sonden- bzw. Primersequenzen können zu der in SEQ ID No. 1 angegebenen
- 15 Sequenz entweder identisch sein oder einige wenige Abweichungen von dieser Sequenz aufweisen.

- Selbstverständlich kann das erfindungsgemäße Verfahren auch mit anderen Verfahren zur Erhöhung der Pathogenresistenz in transgenen Pflanzen kombiniert
- 20 werden. So kann beispielsweise die Polypeptidmenge, die Aktivität oder die Funktion eines oder mehrerer Resistenzfaktoren ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bax Inhibitor 1-Protein aus *Hordeum vulgare* (GenBank Acc.-No.: AJ290421), aus *Nicotiana tabacum* (GenBank Acc.-No.: AF390556), Reis (GenBank Acc.-No.: AB025926), Arabidopsis (GenBank Acc.-No.: AB025927) bzw. Tabak
- 25 und Raps (GenBank Acc.-No.: AF390555, Bolduc et al. (2003) *Planta* 216: 377-386), ROR2 (z.B. aus Gerste (GenBank Acc.-No.: AY246906)), SnAP34 (z.B. aus Gerste (GenBank Acc.-No.: AY247208)) und/oder Luminal Binding Protein BiP z.B. aus Reis (GenBank Acc.-No. AF006825) durch geeignete Verfahren gesteigert

werden. Ebenso kann die Polypeptidmenge, die Aktivität oder die Funktion eines oder mehrerer Resistenzfaktoren ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus RacB (z.B. aus Gerste (GenBank Acc.-No.: AJ344223)), CSL1 (z.B. aus Arabidopsis (GenBank Acc.-No.: NM116593)), HvNaOX (z.B. aus Gerste (GenBank Acc.-No.: 5 AJ251717); EP 1 525 315), MLO (z.B. aus Gerste (GenBank Acc.-No. Z83834); WO 98/04586, WO 00/01722, WO 99/47552), ARM1 (armadillo repeat protein; EP-Anmeldenummer 05110468.5) durch geeignete Verfahren vermindert werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der  
10 erfindungsgemäßen transgenen Organismen und der von ihnen abgeleiteten Zellen, Zellkulturen, Teile – wie zum Beispiel bei transgenen pflanzlichen Organismen Wurzeln, Blätter etc.-, und transgenes Vermehrungsgut wie Saaten oder Früchte, zur Herstellung von Nahrungs- oder Futtermitteln, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

15 In einer Ausführungsform betrifft die Erfindung zudem ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung von Pharmazeutika oder Feinchemikalien in Wirtsorganismen, wobei ein Wirtsorganismus oder ein Teil davon mit einem der oben beschriebenen rekombinanten Nukleinsäuremoleküle transformiert wird und dieses Nukleinsäuremolekül ein oder mehrere Strukturgene enthält, die für die  
20 gewünschte Feinchemikalie kodieren oder die Biosynthese der gewünschten Feinchemikalie katalysieren, der transformierte Wirtsorganismus gezüchtet wird und die gewünschte Feinchemikalie aus dem Züchtungsmedium isoliert wird. Dieses Verfahren ist für Feinchemikalien wie Enzyme, Vitamine, Aminosäuren, Zucker, Fettsäuren, natürliche und synthetische Geschmacks-, Aroma- und Farbstoffe breit  
25 anwendbar. Besonders bevorzugt ist die Produktion von Tocopherolen und Tocotrienolen sowie Carotinoiden. Die Züchtung der transformierten Wirtsorganismen sowie die Isolierung aus den Wirtsorganismen bzw. aus dem Züchtungsmedium erfolgt mit dem Fachmann bekannten Verfahren. Die Produktion

von Pharmazeutika, wie zum Beispiel Antikörpern oder Vakzinen ist beschrieben bei Hood und Jilka (1999). Curr. Opin. Biotechnol.10(4): 382-6; Ma und Vine (1999) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 236: 275-92.

- 5 Die Identifizierung des leucine-rich-repeat-enthaltenden Proteins mit einer Kinasedomäne, RNR8, aus Gerste als Gen, das eine Resistenz der Gerste gegenüber Isolaten von *Blumeria graminis* vermittelt, und seine Anwendung zur Vermittlung der Pathogenresistenz in transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen wird nun im Folgenden dargestellt. Die nachfolgenden Beispiele sollen nicht als beschränkend
- 10 aufgefasst werden. Der Inhalt sämtlicher in dieser Patentanmeldung zitierten Literaturstellen, Patentanmeldungen, Patente und veröffentlichten Patentanmeldungen ist hier durch Bezugnahme aufgenommen.

15 Beispiele

Beispiel 1: Allgemeine Klonierungsverfahren

- Die Klonierungsverfahren wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-
- 20 Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose- und Nylon-Membranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli*-Zellen, Anzucht von Bakterien und die Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (2001), *vide supra*, beschrieben durchgeführt.

25

### Beispiel 2: Sequenzanalyse rekombinanter DNA

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma ABI nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467).

### Beispiel 3: BAC-Screening zur Identifizierung des Klons, der die erfindungsgemäße Sequenz enthält

10 Für die Identifizierung des Genes kodierend für die erfindungsgemäße Sequenz in Gerste wurden DNA-Pools aus einer Gersten-BAC-Bibliothek (Yu et. al. (2000) TAG 101: 1093-99) verwendet. BAC-Klone, welche die erfindungsgemäße Sequenz tragen, wurden mittels PCR unter Verwendung der Primer 5' CTT TCG TGC TTA TGT GGG TGT GAC (SEQ ID NO: 4) und 5' CAT GAG GAG TCT GCA ATA  
15 AGG A (SEQ ID NO: 5) identifiziert.

Die PCR wurde aufgrund ihrer hohen Sensitivität zum Nachweis der gesuchten DNA-Sequenz gewählt. Die Analyse wurde in 20 µl Reaktionsvolumen durchgeführt. Der Reaktionsansatz bestand aus 10 mM Tris-HCl, pH 9,0; 50 mM  
20 KCl; 0,1 % Triton X-100, 0,2 mM dNTP; 2 mM MgCl<sub>2</sub>, je 0,6 µM Oligonukleotide und Taq-Polymerase (Konzentration im Reaktionsansatz: ~ 1U µl<sup>-1</sup>). Pro Reaktionsansatz wurden entweder 10 ng BAC-Pool-DNA oder 2 µl Bakterienkultur (für Kolonie-PCR) verwendet. Vorhandene cDNA-Sequenzen dienten als Grundlage zur Ableitung der Oligonukleotide 5`GGA TTT GTC ACG TCC AAC CT (SEQ ID  
25 NO: 6) und 5`ATT GGC AAT TGT GAT AGC CC (SEQ ID NO: 7).

Die zu amplifizierende BAC-DNA und die Primer wurden vorgelegt und anschließend mit dem PCR-Reaktionsansatz vermischt. Zum Abtöten und

Aufschließen der Bakterien in einer Kolonie-PCR wurde die Vorlage vor der Zugabe des PCR-Reaktionsgemisches für 5 min auf 95°C erhitzt. Zur Denaturierung der doppelsträngigen DNA wurde ein initialer Schritt von 5 min bei 95°C benutzt. Die Touch-Down PCR-Reaktion erfolgte in den Abschnitten 30 s 95°C; 30 s 60 nach  
5 55°C und 60 s 72°C für die ersten 10 Zyklen. Dabei wurde mit jedem Zyklus die Temperatur um 0,5 °C (60 nach 55°C) gesenkt. Weitere 30 Zyklen erfolgten in den Abschnitten 30 s 95°C; 30 s 55°C und 60 s 72°C. Zur abschließenden Kettenverlängerung wurde 5 min bei 72°C inkubiert, bevor die Reaktion auf eine  
10 Experimente erfolgte aufgrund des erwartet kurzen Reaktionsproduktes von 189 bp mit 2,5 %igen Agarosegelen in 0,5x TBE-Puffer.

Identifizierte Einzelklone wurden für die Gen- und Promotoridentifizierung in zwei Stufen subkloniert. Zunächst wurde die BAC-DNA eines Einzelklones mittels  
15 Qiagen-Säule isoliert (Maxi-Kit; Qiagen; Isolierung nach Herstellerprotokoll). Durch Scherung (Hydroshear: Genomic Solutions) wurden von dieser BAC-DNA 5 – 10 kbp Fragmente erzeugt und die entstandenen Enden mit Klenow zu glatten Enden aufgefüllt (Reaktion nach Protokoll des Herstellers). Die Selektion der Fragmentlängen erfolgte über ein 0,8%iges Agarosegel in 0,5 % TBE. Aus dem Gel wurde der  
20 entsprechende Fragmentlängenbereich herausgeschnitten und die DNA aus dem Agarosegel mit Hilfe von Qiagen Gel Extraction Kit eluiert (Elution nach Protokoll des Herstellers). Die eluierten 5-10 kbp Fragmente wurden in einen mit EcoRV linearisierten pBluescript II SK(-) Vektor mit glatten dephosphorylierten Enden ligiert (Restriktion und Dephosphorylierung entsprechend den Herstellerangaben)  
25 und in hochkompetente *E. coli* Zellen chemisch-thermisch transformiert. Anschließend wurden die Transformanten mit Hilfe eines Picking-Roboters (Qpick, Genetix) willkürlich geordnet und in Mikrotiterplatten mit LB-Medium überführt.

- 46 -

Mittels PCR wurde dasjenige Subfragment ausgewählt, welches das interessierende Gen trägt und die Länge des potenziellen 5'-upstream Bereichs maximiert. Das gewählte Subfragment wurde erneut in 1-2 kbp Fragmente geschert, ligiert, transformiert und die Klone in Microtiterplatten gelagert (s.o.). Von den gepickten  
5 Klonen wurden 96 Kolonien willkürlich ausgewählt und mit dem TempliPhi Protokoll nach Herstellerprotokoll sequenziert. Die Sequenzen wurden assembliert. Die erhaltene Sequenzinformation wurde für die Annotation der kodierenden Exons im Vergleich zu bereits bekannten Sequenzen anderer Organismen genutzt, um die erfindungsgemäße Sequenz und ihre potenziellen Promotoren zu bestimmen.

10

#### Beispiel 4: Subklonierung des RNR8-Gens in pIPKTA9

Um genauer zu überprüfen, ob das identifizierte Gen RNR8 für die Vermittlung der Pathogenresistenz verantwortlich ist, wurde dieses Gen anhand des folgenden  
15 Protokolls in den Vektor pIPKTA9 subkloniert:

1. Verdau NBS-LRR BAC (Nr. 027N11) mit *Psp* 1406 I und *Xma*II. Dies schneidet fast den kompletten kodierenden Teil des RNR8-Gens heraus.
2. Blunt ending Enden mit Klenow.
- 20 3. Gelelution der 11 kb Bande von Schritt 2 mit dem Qiagen Gelextraktionskit.
4. Ligation der 11 kb Bande NBS\_LRR (Schritt 3) in TA38 in Anwesenheit von *Swa* I (Douchkov et al. (2005) Molecular Plant-Microbe Interactions 18: 755-761.)
5. PCR eines NBS-LRR 1 kb Fragmentes, um den kodierenden Bereich des  
25 Gens am 5'-Ende (upstream) zu komplettieren. Thermal Ace Polymerase (produziert Fragmente mit blunt ends).  
Primer NBS-LRR F1: GCT GAA CCA ACC CGG GGA GAA ATA  
(SEQ ID NO: 8)

Primer NBS-LRR F1: AGA TGA TCG GAA GAA CAG TGC AAC  
(SEQ ID NO: 9)

6. Purification PCR (Schritt 5) mit MinElute Platten.
  7. Klonierung des 5' NBS-LRR PCR Fragments (Schritt 6) in pIPKTA9,  
5 geschnitten durch *Sma* I.
  8. Verdau des 11kb LRR in TA38 (Schritt 4) mit *Aar* I und *Not* I.
  9. Gelelution des 11 kb LRR von Schritt 8.
  10. Verdau von pIPKTA9\_NBS\_LRR\_5' (Schritt 7) mit *Aar* I und *Not* I
  11. Gelelution ~ 3,5 kb Vektor Bande von Schritt 10
  - 10 12. Ligation der Fragmente von Schritt 7 und 11 mit T4 DNA Ligase  
(Fermentas).
  13. Verifikation des finalen Konstrukts pIPKTA9\_NBS-LRR durch  
Sequenzierung.
- 15 Da mit dem Konstrukt pIPKTA9\_NBS-LRR dieselben Effekte erzielt wurden wie  
mit dem BAC-Klon, konnte daraus geschlossen werden, dass RNR8 das für die  
beobachtete Pathogenresistenz verantwortliche Gen auf BAC Nr. 027N11 ist (siehe  
hierzu auch Abbildung 1).
- 20 Beispiel 5: Transiente Expression in Weizen durch Partikelbeschuss

Folgendes Gemisch von Konstrukten wurde mit einer "Genkanone" (Bio-Rad,  
Modell PDS-1000/He, Hepta-Adapter) mittels biolistischer Transformation gemäss  
der Methode von Douchkov et al. (2005) Mol. Plant-Microbe Interact. 18: 755-761 in

- 25 Weizenblätter eingebracht:

Plasmid	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4
pUbiGUS (Reportergenkonstrukt)	7 µg/Schuss	7 µg/Schuss	7 µg/Schuss	7 µg/Schuss
pIPKTA9 (leerer Überexpressionsvektor)	7 µg/Schuss	---	---	---
pIPKTA9_TaPERO	---		7 µg/Schuss	---
BAC 027N11	---	14 µg/Schuss		---
pIPKTA9_NBS LRR	---	---	---	7 µg/Schuss

- Für die Beschichtung mit DNA wurden pro Schuss 2.18 mg Goldpartikel (1.0 µm Durchmesser, Partikeldichte 25 mg ml<sup>-1</sup> in 50% (v/v) Glycerin) mit 14-21 µg
- 5 “supercoiled” DNA gemischt und mit 1 M Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> pH 10 versetzt, so dass die Endkonzentration von Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0.5 M betrug. Nach Zentrifugieren und Waschen mit 70 % (v/v) Ethanol wurden die Partikel in 96 % (v/v) Ethanol resuspendiert und auf den 7 Makrocarriern verteilt. Die Partikel wurden in einem Vakuum (3.6x10<sup>3</sup> Pa) durch eine Heliumdruckwelle von 7.6x10<sup>6</sup> Pa auf jeweils 7 Blattsegmente von 7
- 10 Tage alten Weizenpflanzen (Sorte Kanzler) eingebracht. Zum Beschuss wurden die Blattsegmente in eine Petrischale auf 0.5% (w/v) Phytoagar gelegt, der mit 20 µg ml<sup>-1</sup> Benzimidazol versetzt war. Die Blätter wurden anschließend bei +20°C und indirektem Tageslicht für 4 h inkubiert.
- 15 Beispiel 6: Inokulation der Blattsegmente

Die bombardierten Blätter wurden auf 1 % (w/v) Phytoagar mit 20 µg ml<sup>-1</sup> Benzimidazol in 20 x 20 cm großen Polycarbonat-Schalen umgelegt. In einem Inokulationsturm erfolgte die Infektion mit Weizenmehltau-Sporen, indem Sporen

von stark infizierten Weizenblättern in den Turm geschüttelt wurden. Die Inokulumdichte lag bei rund 200 Sporen/mm<sup>2</sup>. Nach 5 min wurden die Schalen entfernt, geschlossen und bei +20°C und indirektem Tageslicht für 40-48 h inkubiert.

#### 5 Beispiel 7: Histochemischer GUS-Nachweis

Die Blätter wurden unter Vakuum mit der GUS-Nachweislösung (10 mM EDTA, 1.4 mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 1.4 mM K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 0.1 % (v/v) Triton X-100, 20 % (v/v) Methanol, 1 mg/ml 3-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronsäure, 100 mM Na-  
10 Phosphatpuffer, pH 7.0) infiltriert und über Nacht bei +37°C inkubiert. Nach Entfernen der Nachweislösung wurden die Blätter mit einer Lösung aus 7.5 % (w/v) Trichloressigsäure und 50 % (v/v) Methanol für 15 min bei +20°C entfärbt.

Die Lichtmikroskopie erfolgte mit einem Zeiss Axiolab-Mikroskop bei 200-facher  
15 Vergrößerung. Zellen mit GUS-Expression besitzen einen blau gefärbten Zellinhalt. Mittels quantitativer Mikroskopie wurden pro Schuss die Anzahl GUS-gefärbter Zellen und die Anzahl der GUS-gefärbten Zellen, die mindestens 1 Haustorium des Weizenmehltaupilzes tragen, gezählt. Der Suszeptibilitätsindex berechnete sich aus der Anzahl der haustoriumtragenden GUS-pos. Zellen/Alle GUS-positiven Zellen.

20

Das Ergebnis des Inokulationsexperiments ist in Abbildung 1 dargestellt. Es zeigte sich, dass die Expression des erfindungsgemäßen Proteins vom BAC-Klon oder dem Expressionsvektor pIPKTA9\_NBS-LRR die Suszeptibilität der Weizenpflanzen gegenüber Weizenmehltau im Vergleich zu Pflanzen, die mit dem Leervektor  
25 transformiert worden waren, um etwa 50% reduziert.

Abbildungen

- Abbildung 1: Transientes Komplementationexperiment in Weizen mit Gersten-BAC-Klon 027N11 (Morex BAC-Bank), der die leucine-rich-repeat Proteinkinase Rnr8 enthält. Weizenblätter wurden ko-bombardiert mit pUbiGUS und entweder
- 5 pIPKTA9 (leerer Überexpressionsvektor), BAC-Klon 027N11, pIPKTA9\_NBS LRR (siehe Beispiel 4) oder pIPKTA9:TaPERO (Überexpressionskonstrukt für eine Peroxidase als Positivkontrolle). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 2 unabhängigen Versuchen mit je 2
- 10 Parallelbombardments.

Patentansprüche

1. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, umfassend eine Nukleinsäuresequenz  
5 ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
- i) Nukleinsäuresequenzen umfassend Nukleotidsequenzen, die den  
kodierenden Sequenzen von SEQ ID No. 1 oder Fragmenten davon  
entsprechen,
  - 10 ii) Nukleinsäuresequenzen umfassend Nukleotidsequenzen, die für ein  
Protein mit der in SEQ ID No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz  
oder Fragmenten davon kodieren,
  - iii) Nukleinsäuresequenzen umfassend Nukleotidsequenzen, die zu den  
kodierenden Sequenzen von SEQ ID No. 1 eine Sequenzidentität von  
mindestens 60% aufweisen, und/oder
  - 15 iv) Nukleinsäuresequenzen umfassend Nukleotidsequenzen, die unter  
stringenten Bedingungen mit einem komplementären Strang einer  
Nukleotidsequenz von i) bis iii) hybridisieren,  
die für ein Protein kodiert, welches in Pflanzen eine erhöhte Pathogenresistenz,  
bevorzugt eine erhöhte Pilzpathogenresistenz, vermittelt.
  - 20
2. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, wobei die  
Nukleinsäuresequenz aus *Hordeum vulgare* stammt.
3. Rekombinantes Protein, das in Pflanzen eine erhöhte  
25 Pathogenresistenz, bevorzugt eine erhöhte Pilzpathogenresistenz, vermittelt und  
durch eine Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1 kodiert ist.

4. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül, umfassend die folgenden Elemente in 5'-3'-Orientierung:

- regulatorische Sequenzen eines in Pflanzenzellen aktiven Promotors,
- operativ daran gebunden eine DNA-Sequenz nach Anspruch 1,
- 5 - ggf. operativ daran gebunden regulatorische Sequenzen, die in der Pflanzenzelle als Transkriptions-, Terminations- und/oder Polyadenylierungssignale dienen können.

5. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 4,  
**dadurch gekennzeichnet**, dass die DNA-Sequenz unter der Kontrolle eines  
10 konstitutiven Promotors, bevorzugt dem 35S CaMV- oder Ubiquitinpromotor, exprimiert wird.

6. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 4,  
**dadurch gekennzeichnet**, dass die DNA-Sequenz unter der Kontrolle eines gewebe-  
15 spezifischen Promotors exprimiert wird.

7. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 6,  
**dadurch gekennzeichnet**, dass der gewebespezifische Promotor ein Epidermis-,  
Mesophyll- oder Blattspezifischer Promotor ist.

20

8. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 4,  
**dadurch gekennzeichnet**, dass die DNA-Sequenz unter der Kontrolle eines  
induzierbaren Promotors exprimiert wird.

25 9. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 8,  
**dadurch gekennzeichnet**, dass der induzierbare Promotor ein pathogen- oder  
wundinduzierbarer Promotor ist.

10. Verfahren zur Erhöhung der Pathogenresistenz in transgenen Pflanzen, **dadurch gekennzeichnet**, dass eine DNA-Sequenz nach Anspruch 1 in eine Pflanze bzw. Pflanzenzelle eingeführt und dort exprimiert wird.
- 5 11. Verfahren nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass es die folgenden Schritte umfasst:
- a) Herstellen eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 4 bis 9,
- b) Übertragen des rekombinanten Nukleinsäuremoleküls aus a) in Pflanzenzellen und  
10 gegebenenfalls Integration ins pflanzliche Genom, und
- c) Regenerieren von Pflanzen aus den transformierten Pflanzenzellen.
12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, wobei es sich bei dem Pathogen um ein Pilzpathogen handelt.
- 15 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12, wobei es sich bei dem Pathogen um einen Pilz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Mehltau-, Rost-, Fusarium- und/oder Septoria-Pilzen handelt.
- 20 14. Transgene Pflanzenzelle, umfassend eine Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1 oder ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 4 bis 9 oder erhalten in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 13.
- 15 15. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 14, die einen gegenüber Wildtypzellen erhöhten Gehalt eines Proteins nach Anspruch 3 aufweist.
- 25 16. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 14 oder 15, die eine gegenüber Wildtypzellen erhöhte Pathogenresistenz aufweist.

17. Transgene Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 14 bis 16, die eine gegenüber Wildtypzellen erhöhte Pilzresistenz aufweist.
18. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 17, die eine erhöhte Resistenz gegenüber Mehltau-, Rost- und/oder Septoria-Pilzen aufweist.
19. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 18, die eine erhöhte Resistenz gegenüber *Formae speciales* des Mehltaus aufweist.
20. Transgene Pflanze, umfassend eine Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 14 bis 19 oder hergestellt nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 13, sowie Teile dieser Pflanzen, transgene Ernteprodukte und transgenes Vermehrungsmaterial dieser Pflanzen, wie Protoplasten, Pflanzenzellen, Kalli, Samen, Knollen, Stecklinge, sowie die transgenen Nachkommen dieser Pflanze.
21. Transgene Pflanze nach Anspruch 20, **dadurch gekennzeichnet**, dass es sich bei der transgenen Pflanze um eine monokotyledone Pflanze, bevorzugt um eine Pflanze, die zu den Gattungen *Avena*, *Triticum*, *Secale*, *Hordeum*, *Oryza*, *Panicum*, *Pennisetum*, *Setaria*, *Sorghum*, *Zea* und dergleichen gehört, handelt.
22. Transgene Pflanze nach Anspruch 20, **dadurch gekennzeichnet**, dass es sich bei der transgenen Pflanze um eine dikotyledone Pflanze, bevorzugt um Baumwolle, Leguminosen wie Hülsenfrüchte und insbesondere Alfalfa, Sojabohne, Raps, Canola, Tomate, Zuckerrübe, Kartoffel, Zierpflanzen, Sonnenblume, Tabak sowie Bäume handelt.

23. Verwendung einer DNA-Sequenz nach Anspruch 1 zur Herstellung von transgenen Pflanzen und Pflanzenzellen mit erhöhter Pathogenresistenz.

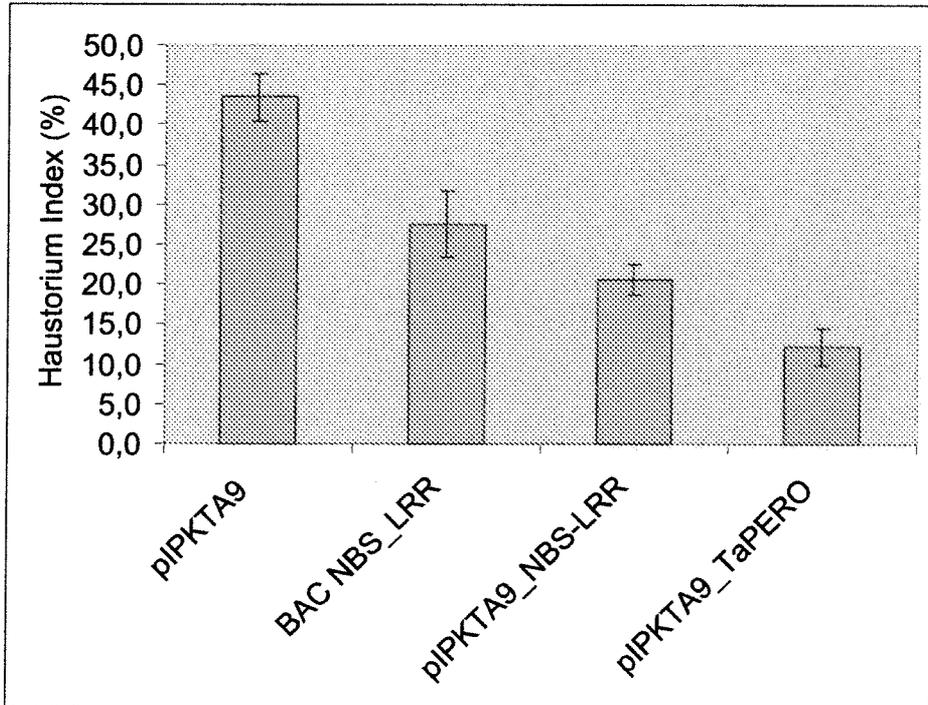


Abb. 1