

(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  
23. Januar 2003 (23.01.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 03/006660 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C12N 15/82**,  
A01H 5/00

[DE/DE]; Brechtstrasse 8, 06484 Quedlinburg (DE).  
**JOST, Ricarda** [DE/DE]; Markt 12, 06484 Quedlinburg (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/07527

(22) Internationales Anmeldedatum:  
5. Juli 2002 (05.07.2002)

(74) **Anwalt: WERNER, Frank**; Basf Aktiengesellschaft,  
67056 Ludwigshafen (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
101 33 407.9 13. Juli 2001 (13.07.2001) US  
101 59 455.0 4. Dezember 2001 (04.12.2001) US  
102 07 582.4 22. Februar 2002 (22.02.2002) US

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): SUNGENE GMBH & CO. KGAA** [DE/DE]; Corrensstrasse 3, 06466 Gatersleben (DE).

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) **Erfinder; und**

(75) **Erfinder/Anmelder (nur für US): HEIM, Ute** [DE/DE]; Wasserstrasse 1, 06466 Gatersleben (DE). **HILLE-BRAND, Helke** [DE/DE]; B2, 11, 68159 Mannheim (DE). **KUNZE, Irene** [DE/DE]; Mühlenweg 11, 06466 Gatersleben (DE). **HERBERS, Karin** [DE/DE]; Am Hange 6, 06484 Quedlinburg (DE). **SONNEWALD, Uwe** [DE/DE]; Am Hange 6, 06484 Quedlinburg (DE). **GLICKMANN, Eric** [FR/DE]; Planstrasse 22, 06458 Hedersleben (DE). **LEIN, Wolfgang** [DE/DE]; Magdeburgstrasse 3, 38176 Cremlingen (DE). **HELL, Rüdiger**

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

(54) **Title:** EXPRESSION CASSETTES FOR THE TRANSGENIC EXPRESSION OF NUCLEIC ACIDS

(54) **Bezeichnung:** EXPRESSIONSKASSETTEN ZUR TRANSGENEN EXPRESSION VON NUKLEINSÄUREN

(57) **Abstract:** The invention relates to expression cassettes and vectors, which contain vegetable constitutive promoters and to the use of said expression cassettes or vectors for the transgenic expression of nucleic acid sequences preferably selection markers in organisms, preferably in plants. The invention also relates to transgenic plants that have been transformed using these expression cassettes or vectors, to cultures, parts or propagation products derived from said plants, and to the use of said plants for producing food and animal feed agents, seeds, pharmaceuticals, or fine chemicals.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft Expressionskassetten und Vektoren, die pflanzliche konstitutive Promotoren enthalten, sowie die Verwendung dieser Expressionskassetten oder Vektoren zur transgenen Expression von Nukleinsäuresequenzen bevorzugt Selektionsmarkern in Organismen, bevorzugt in Pflanzen. Die Erfindung betrifft ferner mit diesen Expressionskassetten oder Vektoren transformierte transgene Pflanzen, davon abgeleitete Kulturen, Teile oder Vermehrungsgut, sowie die Verwendung derselben zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.



WO 03/006660 A1

## Expressionskassetten zur transgenen Expression von Nukleinsäuren

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft Expressionskassetten und Vektoren, die pflanzliche konstitutive Promotoren enthalten, sowie die Verwendung dieser Expressionskassetten oder Vektoren zur transgenen Expression von Nukleinsäuresequenzen - bevorzugt Selektionsmarkern - in Organismen, bevorzugt in Pflanzen. Die Erfindung betrifft ferner mit diesen Expressionskassetten oder Vektoren transformierte transgene Pflanzen, davon abgeleitete Kulturen, Teile oder Vermehrungsgut, sowie die Verwendung derselben zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

Ziel biotechnologischer Arbeiten an Pflanzen ist die Herstellung von Pflanzen mit verbesserten Eigenschaften zum Beispiel zur Steigerung der landwirtschaftlichen Produktivität. Die Herstellung transgener Pflanzen ist eine grundlegende Technik der Pflanzenbiotechnologie und damit eine unerlässliche Voraussetzung für die pflanzliche Grundlagenforschung, sowie für die Herstellung von Pflanzen mit verbesserten, neuen Eigenschaften für die Landwirtschaft, zur Qualitätssteigerung bei Nahrungsmitteln oder zur Produktion bestimmter Chemikalien oder Pharmazeutika (Dunwell JM, J Exp Bot. 2000;51 Spec No:487-96). Oft sind die natürlichen Abwehrmechanismen der Pflanze zum Beispiel gegen Pathogene unzureichend. Die Einführung fremder Gene aus Pflanzen, Tieren oder mikrobiellen Quellen kann die Abwehr verstärken. Beispiele sind der Schutz gegen Insektenfraß in Tabak durch Expression des *Bacillus thuringiensis* Endotoxin unter Kontrolle des 35 S CaMV Promotors (Vaech et al. (1987) Nature 328:33-37) oder der Schutz des Tabaks gegen Pilzbefall durch Expression einer Chitinase aus der Bohne unter Kontrolle des CaMV Promotors (Broglie et al. (1991) Science 254:1194-1197). Ferner kann durch die Einführung fremder Gene eine Herbizidresistenz erzielt werden, was die Anbaubedingungen optimiert und Ernteverluste verringert (Ott KH et al. (1996) J Mol Biol 263(2):359-368). Auch kann die Qualität der Erzeugnisse verbessert werden. So kann die Haltbarkeit und Lagerfähigkeit von Ernteerzeugnissen zum Beispiel durch Inaktivierung bestimmter Reifungsgene erhöht werden. Gezeigt wurde dies zum Beispiel an der Tomate durch Inaktivierung der Polygalacturonase (Hamilton AJ et al. (1995) Curr Top Microbiol Immunol 197:77-89).

## 2

Eine Grundvoraussetzung für die transgene Expression bestimmter Gene in Pflanzen ist die Bereitstellung pflanzenspezifischer Promotoren. Verschiedene pflanzliche Promotoren sind bekannt. Dabei kann zwischen konstitutiven Promotoren, die eine lokal und  
5 zeitlich nur wenig beschränkte Expression in verschiedenen Teilen einer Pflanze ermöglichen, und spezifischen Promotoren, die eine Expression nur in bestimmten Teilen oder Zellen einer Pflanze (z.B. Wurzel, Samen, Pollen, Blättern etc.) oder nur zu bestimmten Zeitpunkten der Entwicklung gestatten, unterschieden  
10 werden. Konstitutive Promotoren werden beispielsweise für die Expression sogenannter Selektionsmarker verwendet. Selektionsmarker (z.B. Antibiotika- oder Herbizidresistenzgene) erlauben es, das Transformationsereignis aus der Vielzahl der nicht transformierten, aber ansonsten identischen pflanzlichen Individuen  
15 herauszufiltern.

Konstitutive in Pflanzen aktive Promotoren sind bislang relativ selten geschrieben. Zu nennen sind der TR-Doppelpromotor aus *Agrobacterium tumefaciens*, die Promotoren der vakuolären ATPase  
20 Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991) sowie der Ppcl Promotor aus *Mesembryanthemum crystallinum* (Cushman et al. (1993) Plant Mol Biol 21:561-566).

Die derzeit in Pflanzen überwiegend verwendeten konstitutiven  
25 Promotoren sind fast ausschließlich virale oder aus *Agrobacterium* isolierte Promotoren. Dabei handelt es sich im einzelnen um den Nopalinsynthase (*nos*) Promotor (Shaw et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12(20):7831-7846), den Mannopinsynthase (*mas*) promotor (Comai et al. (1990) Plant Mol Biol 15 (3):373-381) und den  
30 Octopinsynthase (*ocs*) Promotor (Leisner and Gelvin (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85(5):2553-2557) aus *Agrobacterium tumefaciens* oder der CaMV35S Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaikvirus. Letzterer ist der am häufigsten verwendete Promotor in Expressionssystemen mit ubiquitärer und andauernder Expression  
35 (Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Battraw and Hall (1990) Plant Mol Biol 15:527-538; Benfey et al. (1990) EMBO J 9(69):1677-1684; US 5,612,472). Der häufig als konstitutiver Promoter angewandte CaMV 35S Promotor zeigt jedoch Variationen in der Aktivität in unterschiedlichen Pflanzen und in unter-  
40 schiedlichen Geweben derselben Pflanze (Atanassova et al. (1998) Plant Mol Biol 37:275-85; Battraw and Hall (1990) Plant Mol Biol 15:527-538; Holtorf et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-646; Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907). Ein weiterer Nachteil des 35S Promotors ist, dass bei einer Infektion mit dem  
45 Blumenkohlmosaikvirus und seinen typischen pathogenen Varianten die Expression des Transgens verändert wird. So sind Pflanzen, die das BAR Gen unter der Kontrolle des 35S Promotors exprimieren

## 3

nicht mehr resistent nach Infektion mit dem Virus, der in der Natur typischerweise vorkommt (Al-Kaff et al. (2000) Natur Biotechnology 18:995-99).

- 5 Als Alternative zum CaMV 35S Promotor aus dem Bereich viraler Promotoren wurde der Sugarcane bacilliform badnavirus (ScBV) beschrieben (Schenk et al. (1999) Plant Mol Biol 39(6):1221-1230), der ein dem CaMV ähnliches Expressionsmuster vermittelt. Die Aktivität des ScBV Promotors wurde in transienten Expressions-
- 10 analysen mit verschiedenen zweikeimblättrigen Pflanzen, darunter *Nicotiana tabacum* und *N. benthamiana*, Sonnenblume und Raps, und einkeimblättrigen Pflanzen, hier anhand von Banane, Mais und Hirse, analysiert. In den transienten Analysen in Mais war das ScBV Promotor vermittelte Expressionsniveau vergleichbar mit dem
- 15 des Ubiquitin-Promotors aus Mais (s. unten). Weiterhin wurde die ScBV Promotor-vermittelte Expressionsrate in transgenen Bananen- und Tabakpflanzen getestet und zeigte in beiden Pflanzenspezies im wesentlichen konstitutive Expression.
- 20 Als gängige Promotoren zur Expression von Selektionsmarkern in Pflanzen werden vor allem der *nos*-Promotor, aber auch der *mas*- und *ocs*-Promotor verwendet, die allesamt aus *Agrobacterium*-Stämmen isoliert wurden.
- 25 Der Verwendung viraler Sequenzen wird seitens des Verbrauchers oft mit großem Vorbehalt begegnet. Diese Bedenken werden nicht zuletzt durch Untersuchungen genährt, die die Sicherheit des 35S CaMV Promotors - aufgrund eines möglichen horizontalen Gentransfers bedingt durch einen Rekombinations-"Hot Spot" - in Frage
- 30 stellen (Ho MW et al. (1999) Microbial Ecology in Health and Disease 11:194-197; Cummins J et al. (2000) Nature Biotechnology 18:363). Ein Ziel künftiger biotechnologischer Arbeiten an Pflanzen ist daher der Ersatz viraler genetischer Elemente durch regulatorische pflanzliche Elemente, um so nah wie möglich am
- 35 pflanzlichen System zu bleiben.

- Aufgrund der herrschenden Bedenken hinsichtlich viraler Promotoren gibt es umfangreiche Bemühungen, diese durch pflanzliche Promotoren zu ersetzen. Ein den viralen Elementen ver-
- 40 gleichbarer Promotor pflanzlicher Herkunft ist bislang jedoch noch nicht beschrieben worden.

- Beschrieben wurde ein pflanzlicher Ubiquitin-Promotor aus *Arabidopsis thaliana* (Callis et al. (1990) J Biol Chem 265:12486-
- 45 12493; Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-747). Entgegen den Befunden in den genannten Artikeln, ergaben eigene Untersuchungen, dass der *Arabidopsis* Ubiquitin Promotor für die

Expression von Selektionsmarkergenen ungeeignet ist und seine allgemeine Anwendbarkeit aus diesem Grund in Frage gestellt werden muss (s. Vergleichsbeispiel 1 und 3).

- 5 Das vom Mais-Ubiquitin Promotor vermittelte Expressionsmuster wurde für die Ubi-1 and Ubi-2 Promotoren aus Mais beschrieben (Christensen et al. (1992) Plant Mol Biol 18(4):675-689). Während der Ubi-1 Promotor in Mais und anderen monokotylen Pflanzen gute Expressionsaktivität aufweist, zeigt er in dikotylen Tabak-
- 10 pflanzen nur 10% der Aktivität, die in vergleichbaren Experimenten mit dem viralen 35S Promotor erzielt worden war. Ferner wurde gezeigt, dass der Mais Ubi-1 Promotor für die Überexpression von Genen in monokotylen Pflanzensystemen geeignet ist und darüber hinaus auch hinreichend stark ist, um eine Herbizid-Resistenz
- 15 durch Expression von Selektionsmarkern zu vermitteln (Christensen and Quail (1996) Transgenic Res 5(3):213-218). Für dikotyle Expressionssysteme erwies sich der Ubi-1 promotor als ungeeignet.

- Ein Vergleich der Organspezifität und Stärke verschiedener kon-
- 20stitutiver Promotoren wurde von Holtorf (Holtorf et al. (1995) Plant Mol Biol 29(4):637-646) anhand stabil transformierter *Arabidopsis*-Pflanzen durchgeführt. Die Studie umfasste u.a. den CaMV35S-Promotor, den blattspezifischen Thionin-Promotor aus Gerste und den *Arabidopsis* Ubiquitin-Promotor (UBQ1). Die höchste
- 25 Expressionsrate zeigte der CaMV35S-Promotor. Anhand der Verwendung eines zusätzlichen translationalen Enhancers (TMV omega element) konnte die Expressionsrate des Promotors bei unveränderter Organspezifität um das Zwei- bis Dreifache gesteigert werden. Der blattspezifische Thionin-Promotor aus Gerste war in
- 30 der Mehrzahl der transformierten Linien inaktiv, während der UBQ1 Promotor aus *Arabidopsis* mittlere Expressionsraten ergab.

- McElroy und Mitarbeiter berichteten von einem auf dem Reis Actin 1 (Act1) Promotor basierenden Konstrukt zur Transformation
- 35 monokotyler Pflanzen (McElroy et al. (1991) Mol Gen Genet 231:150-160). Insgesamt wurde aus den zuvor beschriebenen Untersuchungen geschlussfolgert, dass die auf dem Act1-Promotor basierenden Expressionsvektoren dazu geeignet sind, eine hinreichend starke und konstitutive Expression von Fremd-DNA in
- 40 transformierten Zellen monokotyler Pflanzen zu steuern.

- Als konstitutiver Promotor ist ferner der Promotor einer S-Adenosyl-L-Methionin Synthetase beschrieben (WO 00/37662). Nachteilig ist hier vor allem eine Abhängigkeit der Expressions-
- 45 tärke von der Methioninkonzentration (siehe WO 00/37662; Fig. 7).

## 5

WO 99/31258 beschreibt chimäre, konstitutive pflanzliche Promotoren, die sich aus verschiedenen Elementen verschiedener Promotoren mit komplementären Expressionsmustern zusammensetzen, so dass die Kombination einzelner Gewebespezifitäten additiv zu einem konstitutiven Expressionsmuster führt.

Die Ferredoxin NADPH Oxidoreduktase (FNR) ist ein Protein der Elektronentransportkette und reduziert NADP<sup>+</sup> zu NADPH. Experimente in Spinat mit dem Spinat-FNR Promotor, der mit dem GUS Gen fusioniert wurde, deuten auf ein lichtinduzierbares Element im FNR Promotor (Oelmüller et al. (1993) Mol. Gen. Genet. 237:261-72). Aufgrund seiner Funktion wäre für den Promotor ein streng blattspezifisches Expressionsmuster zu erwarten gewesen. Aufgrund des gewebeabhängigen Expressionsmusters wäre der Promotor schlecht geeignet für die Expression von Selektionsmarkern. Hier ist eine Selektion in möglichst allen Gewebeteilen erforderlich, um eine effiziente Selektion zu gewährleisten.

Der Promotor des Triose-Phosphat-Translokators (TPT) sollte aufgrund seiner Funktion während der Photosynthese vorwiegend blattspezifisch sein. Beschrieben sind die cDNAs von Kartoffel (Schulz et al. (1993) Mol Gen Genet 238:357-61), Blumenkohl (Fischer et al. (1997) Plant Cell 9:453-62), Raps (WO 97/25346) und Mais Kammerer B (1998) The Plant Cell 10:105-117). Kammerer et al. zeigen, dass die Mais TPT mRNA Expression stark in den Blättern und den Staubgefäßen erfolgt. Keine Expression ist hingegen im Stengel oder den Wurzeln zu beobachten. Aufgrund des gewebeabhängigen Expressionsmusters wäre der Promotor schlecht für die Expression von Selektionsmarkern geeignet. Hier ist eine Selektion in möglichst allen Gewebeteilen erforderlich, um eine effiziente Selektion zu gewährleisten.

Die im Stand der Technik beschriebenen, sogenannten "konstitutiven" Promotoren weisen einen oder mehrere der nachfolgenden Nachteile auf:

1. Mangelhafte Homogenität der Expression:

Die bekannten, sogenannten "konstitutiven" Promotoren zeigen vielfach eine unterschiedliche Expressionshöhe je nach Gewebe- oder Zelltyp. Zudem ist die Expressionseigenschaft oft stark von dem Insertionsort des Wirtsgenoms abhängig. Dies hat zur Folge, dass die durch heterologe Expression zu erzielenden Effekte nicht in dem gleichen Ausmaß homogen in der Pflanze erreicht werden können. Es kann zu Unter- oder Überdosierungen kommen. Dies kann sich nachteilig auf das Pflanzenwachstum oder den Pflanzenwert auswirken.

2. Mangelhaftes Zeitprofil:  
Die im Stand der Technik bekannten sogenannten "konstitutiven" Promotoren zeigen oft eine nicht konsistente Aktivität während der Entwicklung eines Gewebes. Damit können zum Beispiel in der frühen Phase der somatischen Embryogenese keine wünschenswerten Effekte (wie Selektion) erzielt werden, was gerade hier - aufgrund der Empfindlichkeit des Embryos gegen in vitro Bedingungen und Stressfaktoren - vorteilhaft wäre.
3. Mangelnde Anwendbarkeit auf viele Pflanzenarten:  
Die im Stand der Technik beschriebenen sogenannten "konstitutiven" Promotoren sind oft nicht in allen Arten in gleicher Weise aktiv.
4. Beim Vorliegen mehrerer Expressionskassetten mit jeweils dem gleichen "konstitutiven" Promotor in einem Organismus kann es zu Wechselwirkungen zwischen denselben und sogar zum Abschalten ("Gene Silencing") einzelner Expressionskassetten kommen (Mette et al. (1999) EMBO J 18:241-248).
5. Promotoren viralen Ursprungs können durch Virusinfektionen der transgenen Pflanze beeinflusst werden und die gewünschte Eigenschaft dann nicht mehr ausprägen (Al-Kaff et al. (2000) Natur Biotechnology 18:995-99).
6. Die öffentliche Akzeptanz gegenüber der Verwendung von Promotoren und Elementen aus pflanzlichen Systemen ist höher als bei viralen Systemen.
7. Die Zahl der für die Expression von Selektionsmarkern in Pflanzen geeigneten Promotoren ist gering und sie sind gewöhnlicher Weise viralen oder bakteriellen Ursprungs.
8. Pollen/Antheren-Expression: Die genannten Promotoren (wie beispielsweise 35S CaMV) zeigen eine starke Aktivität im Pollen oder den Staubbeuteln (Antheren). Dies kann unvorteilhafte Auswirkungen auf die Umwelt haben. So hatte eine unspezifische Expression von *Bacillus thuringiensis* Endotoxinen nicht nur den gewünschten Effekt auf Fraßinsekten durch Expression in der Wurzel, sondern auch infolge einer Expression im Pollen bedeutende Schäden im Bestand des Monarchfalters zur Folge, der den Pollen als Hauptnahrungsquelle nutzt (Losey JE et al. (1999) Nature 399, 214).
- Ein idealer konstitutiver Promotor sollte möglichst zahlreiche der nachfolgenden Eigenschaften haben:

- a) Möglichst homogene lokale und zeitliche Genexpression d.h. eine Expression in möglichst vielen Zelltypen oder Geweben eines Organismus während der verschiedenen Phasen des Entwicklungszyklus. Gewünscht wird ferner eine effiziente  
5 Selektion in dedifferentierten Zellen (verschiedenen Kallus-Phasen) aus einer Gewebekultur und weiteren Entwicklungsstadien, die für die Gewebekultur geeignet sind.
- b) Möglichst breite Anwendbarkeit auf verschiedene Pflanzenarten bzw. Anwendbarkeit auf Arten, in denen mit den bisher bekannten "konstitutiven" Promotoren keine Expression erreicht werden kann.  
10
- c) Um eine Kombination von mehreren Transgenen in einer Pflanze zu realisieren, ist es wünschenswert, mehrere Transformationen hintereinander zu schalten oder Konstrukte mit mehreren Promotor-Kassetten zu verwenden, ohne dass durch die mehrmalige Verwendung identischer regulatorischer Sequenzen Silencing-Effekte erzeugt werden.  
15
- d) Einen pflanzlichen Ursprung zur Vermeidung von Akzeptanzproblemen beim Konsumenten und eventuellen zukünftigen Zulassungsproblemen.  
20
- e) Nebenaktivitäten eines Promotors in den Antheren/Pollen sind nicht wünschenswert, zum Beispiel um Umweltschäden zu vermeiden (s.o.).  
25

Die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende Aufgabe bestand also in der Bereitstellung von pflanzlichen regulatorischen Sequenzen, die möglichst viele der oben genannten Eigenschaften erfüllen, vor allem eine ubiquitäre und entwicklungsunabhängige (konstitutive) Expression einer zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz - bevorzugt kodierend für einen Selektionsmarker -  
30 vermitteln. Trotz verschiedener pflanzlicher Promotoren für die eine konstitutive Expression zumindest in einzelnen Arten beansprucht wird, wurde bislang kein Promotor mit den oben aufgezählten gewünschten Eigenschaften beschrieben. Es bestand daher die Aufgabe, entsprechende Promotoren zu identifizieren.  
35

40 Diese Aufgabe wurde gelöst durch Bereitstellung von Expressionskassetten basierend auf den Promotoren eines putativen Ferredoxin Gens (infolge pFD "putative Ferredoxin") aus *Arabidopsis thaliana*, des Ferredoxin NADPH Oxidoreduktase (infolge FNR) Gens aus  
45 *Arabidopsis thaliana* und des Triose-Phosphat Translokator (TPT) Gens aus *Arabidopsis thaliana*:

1.) Promotor eines putativen Ferredoxin (pFD) aus *Arabidopsis thaliana*

Bei der Analyse des *Arabidopsis* Genoms wurde der ORF eines putativen Ferredoxingens identifiziert. Die isolierte 836 bp  
5'-flankierende Sequenz fusioniert mit dem Gen der Glucuronidase zeigte in transgenem Tabak überraschenderweise ein konstitutives Expressionsmuster. Die Sequenz entspricht einem Sequenzabschnitt auf Chromosom 4 von *Arabidopsis thaliana* wie er in der GenBank unter der Acc.-No. Z97337 hinterlegt ist (Version Z97337.2; Basenpaar 85117 bis 85952; das Gen beginnend ab bp 85953 ist mit "strong similarity to ferredoxin [2Fe-2S] I, *Nostoc muscorum*" annotiert). (Das Gen ist nicht zu verwechseln mit dem unter der GenBank Acc.-No: X51370 annotierten *A. thaliana* Gen für Preferredoxin; Vorst O et al. (1990) *Plant Mol Biol* 14(4):491-499).

In den Antheren/Pollen der geschlossenen Blütenknospen konnte nur eine schwache Aktivität, in reifen Blüten gar keine mehr detektiert werden. Entgegen den aus den Literaturbefunden abgeleiteten Vorbehalten gegen eine Eignung des Promotors zur effektiven Expression von Selektionsmarkern (zum Beispiel aufgrund der vermuteten Blattspezifität oder der Funktion im photosynthetischen Elektronentransport), konnte eine hoch-effiziente Selektion durch Kombination mit beispielsweise dem Kanamycin-Resistenzgen (nptII) demonstriert werden.

2.) Ferredoxin NADPH Oxidoreduktase (FNR) Promotor aus *Arabidopsis thaliana*

Ausgehend von den Informationen über die FNR-kodierende cDNA aus *N. tabacum* (GenBank Acc.-No.: Y14032) wurde in der Arabidopsidatenbank nach einem homologen Gen gesucht. Entsprechend dieser Sequenzinformationen wurden Primer synthetisiert. Der über PCR aus genomischer DNA von *Arabidopsis thaliana* amplifizierte Promotor (635 bp), von dem eine blattspezifische Expression erwartet wurde, zeigte in transgenen Tabakpflanzen eine überraschend ubiquitäre und vom Insertionsort unabhängige Expression.

Die Promotorsequenz entspricht teilweise einem Sequenzabschnitt auf Chromosom 5 von *Arabidopsis thaliana* wie er in der GenBank unter der Acc.-No. AB011474 hinterlegt ist (Version AB011474.1 vom 27.12.2000; Basenpaar 70127 bis 69493; das Gen beginnend ab bp 69492 ist mit "ferredoxin-NADP+ reductase" annotiert).

- In den Pollen konnte keine Aktivität detektiert werden. Entgegen den aus den Literaturbefunden abgeleiteten Vorbehalten gegen eine Eignung des Promotors zur effektiven Expression von Selektionsmarkern (zum Beispiel aufgrund der vermuteten Blattspezifität oder der Funktion im photosynthetischen Elektronentransport), konnte eine hocheffiziente Selektion durch Kombination mit beispielsweise dem Phosphinothricin-Resistenzgen (bar/pat) demonstriert werden.
- 10 Die nicht nachweisbare Aktivität des FNR-Promoters in Samen erlaubt eine Nutzung zur Expression von Genen deren Genprodukte in anderen Pflanzenteilen erwünscht und in den Samen unerwünscht sind. Beispielsweise kann eine Abwehr von Schädlingen durch Expression entsprechender Toxine, wie beispielsweise *Bacillus thuringiensis* Kristallproteinen erfolgen. So kann in Kartoffel eine Expression in den oberirdischen Pflanzenorganen (und damit z.B. eine Abwehr von Schädlingen, wie dem Kartoffelkäfer) erreicht werden, ohne dass zu gleich eine Expression in der als Nahrungs- oder Futtermittel genutzten Knolle erfolgt, was die Eignung und Akzeptanz erhöhen könnte.

3.) Triose-Phosphat Translokator (TPT) Promotor aus *Arabidopsis thaliana*

- 25 Ein 2038bp langes PCR Fragment wurde amplifiziert ausgehend von *Arabidopsis* Genbankdaten vom Chromosom V, clone MCL19. Die Promotorsequenz entspricht zum Teil einem Sequenzabschnitt auf Chromosom 5 von *Arabidopsis thaliana* wie er in der GenBank unter der Acc.-No. AB006698 hinterlegt ist (Version AB006698.1 vom 27.12.2000; Basenpaar 53242 bis 55281; das Gen beginnend ab bp 55282 ist mit "phosphate/triose-phosphate translocator" annotiert).
- 30
- 35 Transgene Tabakpflanzen zeigten überraschender Weise nicht nur eine starke Aktivität in zahlreichen Pflanzenteilen. In den Pollen konnte keine Aktivität detektiert werden. Entgegen den aus den Literaturbefunden abgeleiteten Vorbehalten gegen eine Eignung des Promotors zur effektiven Expression von Selektionsmarkern (zum Beispiel aufgrund der vermuteten Blattspezifität), konnte eine hocheffiziente Selektion durch Kombination mit beispielsweise dem Phosphinothricin-Resistenzgen (bar/pat) demonstriert werden.
- 40
- 45 Das ubiquitäre Expressionsmuster, vor allem aber auch die Fähigkeit des TPT Promotors hinsichtlich der Expression von Selektionsmarkern stellt eine große Überraschung für den Fachmann dar, da der Triosephosphattranslokator verantwort-

## 10

lich für den Austausch von C3 Zuckerphosphaten zwischen Cyto-  
sol und Plastiden in photosynthetischen Blättern ist. Der TPT  
ist in der inneren Chloroplasten Membran lokalisiert. Farb-  
lose Plastiden enthalten typischerweise Hexosetransporter  
5 über den der C6-Zuckerphosphat Austausch erfolgt. Es ist  
nicht zu erwarten, dass solche Gene in den frühen Callus  
und Embryogenese Stadien aktiv sind (Stitt (1997) Plant Meta-  
bolism, 2nd ed., Dennis eds. Longman Press, Harlow, UK,  
382-400).

10

Sowohl der pFD, FNR als auch der TPT Promotor erwiesen sich  
als hinreichend stark, um Nukleinsäuresequenzen insbesondere  
Selektionsmarkergene erfolgreich zu exprimieren. Ferner er-  
wiesen sich verschiedene Deletionsvarianten der oben genannten

15 Promotoren, insbesondere eine verkürzte Variante des pFD  
Promotors (699 bp) und des TPT Promotors (1318 bp), als geeignet  
die Expression von beispielsweise Selektionsmarkern wie der  
Kanamycin-Resistenz (nptII) zu gewährleisten.

20 Weiterhin wurden im Rahmen der genannten Arbeiten der *Arabidopsis*  
*thaliana* Ubiquitin-Promotor (Holtorf et al. (1995) Plant Mol Biol  
29:637-646) und der Squalen Synthase-Promotor (Kribii et al.  
(1997) Eur J Biochem 249:61-69) untersucht, die aber beide  
überraschenderweise nicht geeignet waren, Selektionsmarkergen-

25 Expression zu vermitteln, obwohl die Literaturdaten der Ubi-  
quitin-Promotoren aus Monokotylen (siehe oben) hatten vermuten  
lassen, dass insbesondere der Ubiquitin-Promotor einer dikotylen  
Pflanze als Promotor eines Selektionsmarkersystems hätte funk-  
tionieren müssen (siehe Vergleichsbeispiele 1 und 3). Ähnliches gilt

30 für den Squalensynthase-Promotor, dessen Charakterisierung hätte  
erwarten lassen, dass ausreichend hohe Expressionsraten für die  
erfolgreiche Steuerung eines Selektionsmarkergens erzielt werden  
können (Del Arco and Boronat (1999) 4th European Symposium on  
Plant Isoprenoids, 21.-23.4.1999, Barcelona, Spanien) (siehe

35 Vergleichsbeispiele 2 und 3).

Ein erster Gegenstand der Erfindung betrifft daher Expressions-  
kassetten zur transgenen Expression von Nukleinsäuren umfassend

40 a) einen Promotor gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3,

b) ein funktionelles Äquivalent oder äquivalentes Fragment von  
a), das im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie a)  
besitzt,

45

## 11

wobei a) oder b) funktionell mit einer transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz verknüpft sind.

Ferner betrifft die Erfindung Verfahren zur transgenen Expression  
5 von Nukleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, dass eine Nukleinsäuresequenz in funktioneller Verknüpfung mit

a) einem Promotor gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3, oder

10 b) einem funktionellen Äquivalent oder äquivalente Fragment von a), das im wesentlichen die gleichen Promotoraktivitäten wie a) besitzt,

transgen exprimiert wird.

15

Expression umfasst die Transkription der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz, kann aber - im Falle eines offenen Leserahmens in "sense"-Orientierung - auch die Translation der transkribierten RNA der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz  
20 in ein korrespondierendes Polypeptid mit einschließen.

Expressionskassette zur transgenen Expression von Nukleinsäuren oder Verfahren zur transgenen Expression von Nukleinsäuren umfasst alle solche durch gentechnische Methoden zustande gekommene  
25 Konstruktionen oder Verfahren, in denen entweder

a) ein Promotor gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 oder ein funktionelles Äquivalent oder äquivalentes Fragment derselben, oder

30 b) die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz, oder

c) (a) und (b)

sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung (d.h. an  
35 ihrem natürlichen chromosomalen Locus) befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielhaft eine Substitution, Addition, Deletion, Inversion oder Insertion eines oder mehrerer Nukleotidreste sein kann.

40 Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten, von ihnen abgeleitete Vektoren oder die erfindungsgemäßen Verfahren können funktionelle Äquivalente zu den unter SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 beschriebenen Promotorsequenzen umfassen. Funktionell äquivalente Sequenzen umfassen auch all die Sequenzen, die von dem komplementären Gegen-  
45 strang der durch SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 definierten Sequenzen ab-

## 12

geleitet sind und im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität aufweisen.

Funktionelle Äquivalente in bezug auf die erfindungsgemäßen Promotoren meint insbesondere natürliche oder künstliche Mutationen der unter SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 beschriebenen Promotorsequenzen sowie deren Homologen aus anderen Pflanzengattungen und -arten, welche weiterhin im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität aufweisen.

10

Eine Promotoraktivität wird im wesentlichen als gleich bezeichnet, wenn die Transkription eines bestimmten zu exprimierenden Gens unter Kontrolle eines bestimmten von SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 abgeleiteten Promotors unter ansonsten unveränderten Bedingungen

15 eine Lokalisation innerhalb der Pflanze aufweist, die zu mindestens 50%, bevorzugt mindestens 70%, besonders bevorzugt mindestens 90% ganz besonders bevorzugt mindestens 95% deckungsgleich ist mit einer Vergleichsexpression erhalten unter Verwendung eines des durch SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 beschriebenen Promotors.

20 Dabei kann die Expressionshöhe sowohl nach unten als auch nach oben im Vergleich zu einem Vergleichswert abweichen. Bevorzugt sind dabei solche Sequenzen, deren Expressionshöhe, gemessen anhand der transkribierten mRNA oder dem infolge translatierten Protein, unter ansonsten unveränderten Bedingungen quantitativ um

25 nicht mehr als 50%, bevorzugt 25%, besonders bevorzugt 10 % sich von einem Vergleichswert erhalten mit einem durch SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 beschriebenen Promotor unterscheidet. Besonders bevorzugt sind solche Sequenzen, deren Expressionshöhe, gemessen anhand der transkribierten mRNA oder dem infolge translatierten Protein,

30 unter ansonsten unveränderten Bedingungen quantitativ um mehr als 50%, bevorzugt 100%, besonders bevorzugt 500%, ganz besonders bevorzugt 1000% eines Vergleichswert erhalten mit dem durch SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 beschriebenen Promotor übersteigt. Bevorzugt ist als Vergleichswert die Expressionshöhe der natürlichen  
35 mRNA des jeweiligen Gens oder des natürlichen Genproduktes.

Bevorzugt ist ferner als Vergleichswert die Expressionshöhe erhalten mit einer beliebigen, aber bestimmten Nukleinsäuresequenz, bevorzugt solchen Nukleinsäuresequenzen, die für leicht quantifizierbare Proteine kodieren. Ganz besonders bevorzugt sind dabei

40 Reporter-Proteine (Schenborn E, Groskreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) wie das "green fluorescence protein" (GFP) (Chui WL et al., Curr Biol 1996, 6:325-330; Leffell SM et al., Biotechniques. 23(5):912-8, 1997), die Chloramphenicoltransferase, eine Luziferase (Millar et al., Plant Mol Biol Rep 1992

45 10:324-414) oder die  $\beta$ -Galactosidase, ganz besonders bevorzugt

## 13

ist die  $\beta$ -Glucuronidase (Jefferson et al. (1987) EMBO J. 6:3901-3907).

Ansonsten unveränderte Bedingungen bedeutet, dass die Expression, 5 die durch eine der zu vergleichenden Expressionskassetten initiiert wird, nicht durch Kombination mit zusätzlichen genetischen Kontrollsequenzen, zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, modifiziert wird. Unveränderte Bedingungen bedeutet ferner, dass alle Rahmenbedingungen wie beispielsweise Pflanzenart, Ent- 10 wicklungsstadium der Pflanzen, Zuchtbedingungen, Assaybedingungen (wie Puffer, Temperatur, Substrate etc.) zwischen den zu vergleichenden Expressionen identisch gehalten werden.

Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, 15 Inversionen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfasst, welche man durch Modifikation eines Promotors gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann die weitere Eingrenzung der 20 darin enthaltenen Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzymchnittstellen, die Entfernung überflüssiger DNA oder das Hinzufügen weiterer Sequenzen, zum Beispiel weiterer regulatorischer Sequenzen, sein.

25 Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen, wie z.B. Transitionen und Transversionen, in Frage kommen, können an sich bekannte Techniken, wie in vitro-Mutagenese, "primer repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Durch Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhän- 30 gen für "blunt ends" können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden. Zu analogen Ergebnissen kann man auch unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung spezifischer Oligonukleotid-Primer kommen.

35 Unter Homologie zwischen zwei Nukleinsäuren wird die Identität der Nukleinsäuresequenz 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 40 folgender Parameter berechnet wird:

Gap Weight: 12

Length Weight: 4

Average Match: 2,912

Average Mismatch: -2,003

## 14

Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 50 % auf Nukleinsäurebasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO. 1, 2 oder 3 nach 5 obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 50 % aufweist.

Funktionelle Homologe zu den obengenannten Promotoren zur Verwendung in den erfindungsgemäßen Expressionskassetten umfasst 10 bevorzugt solche Sequenzen, die eine Homologie aufweisen von mindestens 50 %, bevorzugt 70 %, vorzugsweise mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 99% über eine Länge von von mindestens 100 Basenpaaren, bevorzugt mindestens 200 Basen- 15 paaren, besonders bevorzugt von mindestens 300 Basenpaaren, ganz besonders bevorzugt von mindestens 400 Basenpaaren, am meistens bevorzugt von mindestens 500 Basenpaaren.

Weitere Beispiele für die in den erfindungsgemäßen Expressions- 20 kassetten oder Vektoren zum Einsatz kommenden Promotorsequenzen lassen sich beispielsweise in verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie beispielsweise Arabidopsis thaliana, Brassica napus, Nicotiana tabacum, Solanum tuberosum, Helianthium anuus, Linum sativum durch Homologievergleiche in 25 Datenbanken leicht auffinden.

Funktionelle Äquivalente meint ferner DNA Sequenzen, die unter Standardbedingungen mit der Nukleinsäuresequenz kodierend für einen Promotor gemäß SEQ ID NO:1, 2 oder 3 oder der zu ihr 30 komplementären Nukleinsäuresequenzen hybridisieren und die im wesentlichen gleichen Eigenschaften haben. Standardhybridisierungsbedingungen ist breit zu verstehen und meint sowohl stringente als auch weniger stringente Hybridisierungsbedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind unter anderem 35 bei Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T et al., in Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. beschrieben.

40

Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrilles ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit ungefähr 2X SSC bei 50°C) und solchen mit hoher Stringenz (mit ungefähr 0.2X SSC bei 50°C bevor- 45 zugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M NaCl, pH 7.0). Darüber hinaus kann die Temperatur während des Waschschrilles von niedrig stringenten Bedingungen bei Raumtemperatur, ungefähr 22°C,

## 15

bis zu stärker stringenten Bedingungen bei ungefähr 65°C angehoben werden. Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden.

- 5 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:

10

(1) Hybridisierungsbedingungen mit zum Beispiel

a) 4X SSC bei 65°C, oder

15

b) 6X SSC, 0.5% SDS, 100 µg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA bei 65°C, oder

c) 4X SSC, 50% Formamid, bei 42°C, oder

20

d) 6X SSC, 0.5% SDS, 100 µg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA, 50% Formamid bei 42°C, oder

e) 2X oder 4X SSC bei 50°C (schwach stringente Bedingung), oder

25

f) 2X oder 4X SSC, 30 bis 40% Formamid bei 42°C (schwach stringente Bedingung).

g) 6x SSC bei 45°C, oder,

30

h) 50% Formamid, 4xSSC bei 42°C, oder

i) 50% (vol/vol) Formamid, 0,1% Rinderserumalbumin, 0,1% Ficoll, 0,1% Polyvinylpyrrolidon, 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,5, 750 mM NaCl, 75 mM Natriumcitrate bei 42°C, oder

35

j) 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0, 2 mM EDTA, 1% BSA und 7% SDS.

40

(2) Waschschritte mit zum Beispiel

a) 0,1X SSC bei 65°C, oder

45

b) 0,1X SSC, 0,5% SDS bei 68°C, oder

## 16

- c) 0,1X SSC, 0,5% SDS, 50% Formamid bei 42°C, oder
- d) 0,2X SSC, 0,1% SDS bei 42°C, oder
- 5 e) 2X SSC bei 65°C (schwach stringente Bedingung), oder
- f) 40 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0, 1% SDS, 2 mM EDTA.

Verfahren zur Herstellung erfindungsgemäßer funktioneller Äqui-  
10 valente umfasst bevorzugt die Einführung von Mutationen in einen Promotor gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3. Eine Mutagenese kann unge- richtet ("random") erfolgen, wobei die mutagenisierten Sequenzen anschließend bezüglich ihrer Eigenschaften nach einer "trial- by-error" Prozedur durchmustert werden. Besonders vorteilhafte  
15 Selektionskriterien umfassen beispielsweise eine erhöht Resistenz gegenüber einem Selektionsmarker, die Höhe der resultierenden Expression der eingeführten Nukleinsäuresequenz.

Alternativ können nicht-essentielle Sequenzen eines erfindungs-  
20 gemäßen Promotors deletiert werden ohne die genannten Eigen- schaften signifikant zu beeinträchtigen. Derartige Deletions- varianten stellen funktionell äquivalente Fragmente der Promoto- ren beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 dar. Beispielhaft sei für derartige Deletionsmutanten oder funktionell äquivalente  
25 Fragmente die verkürzte pFD-Promotorsequenz (pFDs) gemäß SEQ ID NO: 4 oder die verkürztet TPT-Promotorsequenz gemäß SEQ ID NO: 27 zu nennen, die als funktionell äquivalente Teile ihrer jeweiligen Ausgangspromotoren ausdrücklich mit umfasst sind.

30 Die Eingrenzung der Promotorsequenz auf bestimmte, essentielle regulatorische Regionen kann auch mit Hilfe von Suchroutine zur Suche von Promotorelementen vorgenommen werden. Oft sind in den für die Promotoraktivität relevanten Regionen bestimmte Promotor- elemente gehäuft vorhanden. Diese Analyse kann beispielsweise mit  
35 Computerprogrammen wie dem Programm PLACE ("Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements") vorgenommen werden (K. Higo et al., (1999) Nucleic Acids Research 27:1, 297-300) oder der BIOBASE Datenbank "Transfac" (Biologische Datenbanken GmbH, Braunschweig)

40 Verfahren zur Mutagenisierung von Nukleinsäuresequenzen sind dem Fachmann bekannt und schließen beispielhaft die Verwendung von Oligonukleotiden mit einer oder mehr Mutationen im Vergleich zu der zu mutierenden Region ein (z.B. im Rahmen einer "Site- specific mutagenesis"). Typischerweise kommen Primer mit ungefähr  
45 15 bis ungefähr 75 Nukleotiden oder mehr zum Einsatz, wobei be- vorzugt ca. 10 bis ca. 25 oder mehr Nukleotidreste an beiden Seiten der zu verändernden Sequenz lokalisiert sind. Details

## 17

und Durchführung besagter Mutageneseverfahren sind dem Fachmann geläufig (Kunkel et al., *Methods Enzymol*, 154:367-382, 1987; Tomic et al. (1990) *Nucl Acids Res* 12:1656; Upender, Raj, Weir (1995) *Biotechniques* 18(1):29-30; US 4,237,224). Eine Mutagenese  
5 kann auch durch Behandlung von beispielsweise Vektoren, die eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen enthalten, mit mutagenisierenden Agentien wie Hydroxylamin realisiert werden.

Die in den erfindungsgemäßen Expressionskassetten enthaltenen  
10 transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können mit weiteren genetischen Kontrollsequenzen neben einem der erfindungsgemäßen Promotoren funktionell verknüpft sein.

Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel  
15 die sequentielle Anordnung eines Promotors, der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der transgenen Expression der Nukleinsäuresequenz, je nach Anordnung der Nukleinsäure-  
20 sequenzen zu sense oder anti-sense RNA, erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die  
25 Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz hinter der als Promotor fungierenden Sequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Promotorsequenz und der transgen  
30 zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.

Die Herstellung einer funktionellen Verknüpfung kann mittels  
35 gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, *Experiments with Gene*  
40 *Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind. Zwischen beide Sequenzen können aber auch weitere Sequenzen positioniert werden, die zum Beispiel die  
45 Funktion eines Linkers mit bestimmten Restriktionsenzymchnitt-

stellen oder eines Signalpeptides haben. Auch kann die Insertion von Sequenzen zur Expression von Fusionsproteinen führen.

Der Begriff der genetischen Kontrollsequenzen ist breit zu verstehen und meint all solche Sequenzen, die einen Einfluss auf das Zustandekommen oder die Funktion der erfindungsgemäßen Expressionskassette 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 exprimierenden Nukleinsäuresequenz einen der erfindungsgemäßen Promotoren 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, 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) und Hitzestress (Schöffl F et al. (1989) Molecular & General Genetics 217(2-3):246-53) beschrieben.

Es können ferner weitere Promotoren funktionell mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz verknüpft sein, die eine Expression in weiteren Pflanzengewebe oder in anderen Organismen, wie zum Beispiel *E.coli* Bakterien ermöglichen. Als Pflanzenpromotoren kommen im Prinzip alle oben beschriebenen Promotoren in Frage. Vorstellbar ist zum Beispiel, dass eine bestimmte Nukleinsäuresequenz durch einen Promotor (zum Beispiel einen der erfindungsgemäßen Promotoren) in einem Pflanzengewebe als sense-RNA transkribiert und in das entsprechende Protein translatiert wird, während die gleiche Nukleinsäuresequenz durch einen anderen Promotor mit einer anderen Spezifität in einem anderen Gewebe zu anti-sense-RNA transkribiert und das entsprechende Protein herunterreguliert wird. Dieses kann durch eine erfindungsgemäße Expressionskassette realisiert werden, indem der eine Promotor vor die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz positioniert wird und der andere Promotor dahinter.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Region, Introns oder die nichtkodierende 3'-Region von Genen, bevorzugt der pFD, FNR oder TPT-Gene. Es ist gezeigt

## 19

worden, dass diese eine signifikante Funktionen bei der Regulation der Genexpression spielen können. So wurde gezeigt, dass 5'-untranslatierte Sequenzen die transiente Expression heterologer Gene verstärken können. Sie können ferner die Gewebespezifität fördern (Rouster J et al. (1998) Plant J. 15:435-440.). Umgekehrt unterdrückt die 5'-untranslatierte Region des opaque-2 Gens die Expression. Eine Deletion der entsprechenden Region führt zu einer Erhöhung der Genaktivität (Lohmer S et al. (1993) Plant Cell 5:65-73). Die unter SEQ ID NO:1, 2 oder 3 angegebene Nukleinsäuresequenz enthält den Abschnitt der pFD, FNR oder TPT-Gene, der den Promotor und die 5'-untranslatierte Region bis vor das ATG-Startcodon des jeweiligen Proteins repräsentiert.

McElroy und Mitarbeiter (McElroy et al. (1991) Mol Gen Genet 231(1):150-160) berichteten von einem auf dem Reis Actin 1 (Act1) Promotor basierenden Konstrukt zur Transformation monokotyler Pflanzen. In transgenen Reiszellen führte die Verwendung des Act1-Introns in Kombination mit dem 35S-Promotor zu einer gegenüber dem isolierten 35S-Promotor um das Zehnfache gesteigerten Expressionsrate. Eine Optimierung der Sequenzumgebung der Translations-Initiationsstelle des Reporter-gens (GUS) resultierte in einer vierfachen Steigerung der GUS-Expression in transformierten Reiszellen. Eine Kombination der optimierten Translations-Initiationsstelle und des Act1-Introns resultierte in einer 40-fachen Steigerung der GUS-Expression durch den CaMV35S-Promotor in transformierten Reiszellen; ähnliche Ergebnisse wurden anhand von transformierten Maiszellen erzielt. Insgesamt wurde aus den zuvor beschriebenen Untersuchungen geschlussfolgert, dass die auf dem Act1-Promotor basierenden Expressionsvektoren dazu geeignet sind, eine hinreichend starke und konstitutive Expression von Fremd-DNA in transformierten Zellen monokotyler Pflanzen zu steuern.

Die Expressionskassette 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 Nukleinsäuresequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien in einer der erfindungsgemäßen Expressionskassetten enthalten sein.

Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom erlauben. Bei der homologen Rekombination kann zum Beispiel

- der natürliche Promotor eines bestimmten Gens gegen einen der erfindungsgemäßen Promotoren ausgetauscht werden. Methoden wie die cre/lox-Technologie erlauben eine gewebespezifische, unter Umständen induzierbare Entfernung der Expressionskassette
- 5 aus dem Genom des Wirtsorganismus (Sauer B. (1998) Methods. 14(4):381-92). Hier werden bestimmte flankierende Sequenzen dem Zielgen angefügt (lox-Sequenzen), die später eine Entfernung mittels der cre-Rekombinase ermöglichen.
- 10 Der einzuführende Promotor kann mittels homologer Rekombination vor das transgen zu exprimierende Zielgen platziert werden, indem der Promotor mit DNA-Sequenzen verknüpft wird, die zum Beispiel zu endogenen Sequenzen homolog sind, die dem Leseraster des Zielgens vorgelagert sind. Derartige Sequenzen sind als genetische
- 15 Kontrollsequenzen zu verstehen. Nachdem eine Zelle mit dem entsprechenden DNA-Konstrukt transformiert wurde, können die beiden homologen Sequenzen interagieren und so die Promotorsequenz an dem gewünschten Ort vor dem Zielgen platzieren, so dass die Promotorsequenz nun in funktioneller Verknüpfung mit dem Zielgen
- 20 steht und eine erfindungsgemäße Expressionskassette bildet. Die Auswahl der homologen Sequenzen bestimmt den Insertionsort des Promotors. Hierbei kann die Expressionskassette durch homologe Rekombination mittels einer einfachen oder einer doppelt-reziproken Rekombination generiert werden. Bei der einfach reziproken
- 25 Rekombination wird nur eine einzelne Rekombinationssequenz verwendet und es erfolgt die Insertion der gesamten eingeführten DNA. Bei der doppelt-reziproken Rekombination ist die einzuführende DNA durch zwei homologe Sequenzen flankiert und es erfolgt die Insertion des flankierten Bereiches. Letzteres Ver-
- 30 fahren ist geeignet, um wie oben beschrieben den natürlichen Promotor eines bestimmten Gens gegen einen der erfindungsgemäßen Promotoren auszutauschen und so den Expressionsort und -zeitpunkt dieses Gens zu modifizieren. Diese funktionelle Verknüpfung stellt eine erfindungsgemäße Expressionskassette dar.
- 35 Zur Selektion erfolgreich homolog rekombinierter oder auch transformierter Zellen ist es in der Regel erforderlich, einen selektionierbaren Marker zusätzlich einzuführen, der den erfolgreich rekombinierten Zellen eine Resistenz gegen ein Biozid
- 40 (zum Beispiel ein Herbizid), einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456) oder ein Antibiotikum verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion der transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al., Plant Cell Reports 5 (1986), 81-84).

## 21

Homologe Rekombination ist ein relativ seltenes Ereignis in höheren Eukaryoten, vor allem in Pflanzen. Zufällige Integrationen in das Wirtsgenom überwiegen. Eine Möglichkeit die zufällig integrierten Sequenzen zu entfernen und so Zellklone mit einer korrekten homologen Rekombination anzureichern, besteht in der Verwendung eines sequenzspezifischen Rekombinationssystems wie in US 6,110,736 beschrieben. Dieses besteht aus drei Elementen: zwei Paaren von spezifischen Rekombinationssequenzen und einer sequenzspezifischen Rekombinase. Diese Rekombinase katalysiert eine Rekombination lediglich zwischen den beiden Paaren von spezifischen Rekombinationsequenzen. Das eine Paar dieser spezifischen DNA-Sequenzen wird außerhalb der zu integrierenden DNA-Sequenz, d.h. außerhalb der beiden homologen DNA-Sequenzen lokalisiert. Im Falle einer korrekten homologen Rekombination werden diese Sequenzen nicht mit in das Genom übertragen. Im Falle einer zufälligen Integration insertieren sie in der Regel zusammen mit dem Rest des Konstruktes. Unter Einsatz einer speziellen Rekombinase und eines Konstruktes enthaltend ein zweites Paar der spezifischen Sequenzen können die zufällig insertierten Sequenzen herausgeschnitten oder durch Inversion inaktiviert werden, während die korrekt über homologe Rekombination insertierten Sequenzen im Genom verbleiben. Eine Vielzahl von sequenzspezifischen Rekombinationssystemen kann verwendet werden, beispielhaft sind das Cre/lox-System des Bacteriophagen P1, das FLP/FRT System der Hefe, die Gin Recombinase des Mu Phagen, die Pin Rekombinase aus E. coli und das R/RS System des pSR1 Plasmids genannt. Bevorzugt sind das Bacteriophagen P1 Cre/lox und das Hefe FLP/FRT System. Hier interagiert die Rekombinase (Cre oder FLP) spezifisch mit ihren jeweiligen Rekombinationssequenzen (34bp lox-Sequenz bzw. 47bp FRT-Sequenz) um die zwischengelagerten Sequenzen zu deletieren oder zu invertieren. Das FLP/FRT und cre/lox Rekombinasesystem wurde bereits in pflanzlichen Systemen angewendet (Odell et al. (1990) Mol Gen Genet 223:369-378)

Als Kontrollsequenzen geeignete Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale sowie - 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 :835ff) oder funktionelle Äquivalente davon.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält die Expressionskassette eine in Pflanzen funktionelle Terminatorsequenz. In Pflanzen funktionelle Terminatorsequenzen meint allgemein solche Sequenzen, die in der Lage sind, in Pflanzen den Abbruch der Transkription einer DNA-Sequenz zu bewirken. Beispiele

## 22

für geeignete Terminatorsequenzen sind der OCS (Octopin-Synthase)-Terminator und der NOS (Nopalin-Synthase)-Terminator. Besonders bevorzugt sind jedoch pflanzliche Terminatorsequenzen. Pflanzliche Terminatorsequenzen meint allgemein solche Sequenzen, die Bestandteil eines natürlichen pflanzlichen Gens sind. Besonders bevorzugt sind dabei der Terminator des Cathepsin D Inhibitor Gens aus Kartoffel (GenBank Acc. No.: X74985; Terminator: SEQ ID NO: 28) oder des Terminators der Speicherproteingens VfLElB3 (GenBank Acc. No.: Z26489; Terminator: SEQ ID NO: 29) aus der Ackerbohne. Diese Terminatoren sind den im Stand der Technik beschriebenen viralen oder T-DNA Terminatoren mindestens gleichwertig. Das Plasmid pSUN5NPTIICat (SEQ ID NO: 24) enthält den pflanzlichen Terminator des Cathepsin D Inhibitor Gens aus Kartoffel.

15

Dem Fachmann ist eine Vielzahl von Nukleinsäuren bzw. Proteinen bekannt, deren rekombinante Expression gesteuert durch die erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder Verfahren vorteilhaft ist. Ferner sind dem Fachmann eine Vielzahl von Genen bekannt, durch deren Reprimierung oder Ausschaltung mittels Expression einer entsprechenden antisense-RNA ebenfalls vorteilhafte Effekte erreicht werden können. Beispielhaft jedoch nicht einschränkend für vorteilhafte Effekte seien zu nennen:

25 - Erleichterte Herstellung eines transgenen Organismus beispielsweise durch die Expression von Selektionsmarkern

- Erzielen einer Resistenz gegen abiotische Stressfaktoren (Hitze, Kälte, Trockenheit, erhöhte Feuchtigkeit, Umweltgifte, UV-Strahlung)

- Erzielen einer Resistenz gegen biotische Stressfaktoren (Pathogene, Viren, Insekten und Krankheiten)

35 - Verbesserung von Nahrungs- oder Futtereigenschaften

- Verbesserung der Wachstumsrate oder des Ertrages.

Nachfolgend seien einige konkrete Beispiele für Nukleinsäuren genannt, deren Expression die gewünschten vorteilhaften Effekte bietet:

#### 1. Selektionsmarker

45 Selektionsmarker umfasst sowohl positive Selektionsmarker, die eine Resistenz gegen ein Antibiotikum, Herbizid oder Biozid verleihen, als auch negative Selektionsmarker, die eine

## 23

Sensitivität gegen eben diese verleihen, als auch Marker die dem transformierten Organismus einen Wachstumsvorteil gewähren (beispielsweise durch Expression von Schlüsselgenen der Cytokinbiosynthese; Ebinuma H et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 94:2117-2121). Bei der positiven Selektion gedeihen nur die Organismen, die den entsprechenden Selektionsmarker exprimieren, während bei der negativen Selektion eben diese eingehen. Bei der Herstellung transgener Pflanzen ist die Verwendung eines positiven Selektionsmarkers bevorzugt. Bevorzugt ist ferner die Verwendung von Selektionsmarkern, die Wachstumsvorteile verleihen. Negative Selektionsmarker können vorteilhaft verwendet werden, wenn es darum geht, bestimmte Gene oder Genomabschnitte aus einem Organismus zu entfernen (beispielsweise im Rahmen eines Kreuzungsprozesses).

Der mit der Expressionskassette eingebrachte selektionierbare Marker verleiht den erfolgreich rekombinierten oder transformierten Zellen eine Resistenz gegen ein Biozid (zum Beispiel ein Herbizid wie Phosphinothricin, Glyphosat oder Bromoxynil), einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456) oder ein Antibiotikum, wie zum Beispiel Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion der transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al., Plant Cell Reports 5 (1986), 81-84). Besonders bevorzugte Selektionsmarker sind solche die eine Resistenz gegen Herbizide verleihen. Dem Fachmann sind zahlreiche derartiger Selektionsmarker und die für diese kodierenden Sequenzen bekannt. Nachfolgend seien beispielhaft jedoch nicht einschränkend zu nennen:

i) Positive Selektionsmarker:

Der mit der Expressionskassette eingebrachte selektionierbare Marker verleiht den erfolgreich rekombinierten oder transformierten Zellen eine Resistenz gegen ein Biozid (zum Beispiel ein Herbizid wie Phosphinothricin, Glyphosat oder Bromoxynil), einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456) oder ein Antibiotikum, wie zum Beispiel Tetracycline, Ampicillin, Kanamycin, G 418, Neomycin, Bleomycin oder Hygromycin. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion der transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al., Plant Cell Reports 5 (1986), 81-84). Besonders bevorzugte Selektionsmarker sind solche die

eine Resistenz gegen Herbizide verleihen. Beispielhaft als Selektionsmarker seien genannt:

- 5        -     DNA Sequenzen, die für Phosphinothricinacetyltransferasen (PAT) kodieren, welche die freie Aminogruppe des Glutaminsynthaseinhibitors Phosphinothricin (PPT) acetylieren und damit eine Detoxifizierung des PPT erreichen (de Block et al. 1987, EMBO J. 6, 2513-2518) (auch Bialophos®-Resistenzgen (bar) genannt). Das bar Gen  
10        kodierend für eine Phosphinothricinacetyltransferase (PAT) kann aus beispielsweise *Streptomyces hygroscopicus* oder *S. viridochromogenes* isoliert werden. Entsprechende Sequenzen sind dem Fachmann bekannt (aus *Streptomyces hygroscopicus* GenBank Acc.-No.: X17220 und X05822, aus  
15        *Streptomyces viridochromogenes* GenBank Acc.-No.: M 22827 und X65195; US 5,489,520). Ferner sind synthetische Gene beispielsweise für die Expression in Plastiden beschrieben AJ028212. Ein synthetisches Pat Gen ist beschrieben bei Becker et al. (1994) The Plant J 5:299-307. Ganz be-  
20        sondern bevorzugt ist ebenfalls die Expression des Polypeptides gemäß SEQ ID NO: 5, beispielsweise kodiert durch eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 4. Die Gene verleihen Resistenz gegen das Herbizid Bialophos® oder Glufosinat und sind vielbenutzte Marker in transgenen  
25        Pflanzen (Vickers JE et al. (1996) Plant Mol Biol Reporter 14:363-368; Thompson CJ et al. (1987) EMBO J 6:2519-2523).
- 30        -     5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthasegene (EPSP Synthasegene), die eine Resistenz gegen Glyphosat® (N-(phosphonomethyl)glycin) verleihen. Das unselektive Herbizid Glyphosat hat die 5-Enolpyruvyl-3-phospho-  
35        shikimatsynthase (EPSPS) als molekulares Target. Diese hat eine Schlüsselfunktion in der Biosynthese aromatischer Aminosäuren in Mikroben und Pflanzen, jedoch nicht in Säugern (Steinrucken HC et al. (1980) Biochem Biophys Res Commun 94:1207-1212; Levin JG und Sprinson DB (1964) J Biol Chem 239:1142-1150; Cole DJ (1985) Mode of action of glyphosate; A literature analysis, p. 48-74. In:  
40        Grossbard E und Atkinson D (eds.) The herbicide glyphosate. Buttersworths, Boston.). Glyphosat-tolerante EPSPS Varianten werden bevorzugt als Selektionsmarker verwendet (Padgett SR et al. (1996). New weed control opportuni-  
45        ties: development of soybeans with a Roundup Ready™ gene. In: Herbicide Resistant Crops (Duke SO, ed.), pp. 53-84. CRC Press, Boca Raton, FL; Saroha MK und Malik VS (1998) J Plant Biochemistry and Biotechnology 7:65-72).

## 25

Das EPSPS Gen des *Agrobacterium* sp. strain CP4 hat eine natürliche Toleranz gegen Glyphosat, die auf entsprechende transgene Pflanzen transferiert werden kann. Das CP4 EPSPS Gen wurde aus *Agrobacterium* sp. strain CP4 kloniert (Padgett et al. (1995) *Crop Science* 35(5):1451-1461). 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate-synthasen, die Glyphosat-tolerant sind, wie beispielsweise beschrieben in US 5,510,471; US 5,776,760; US 5,864,425; US 5,633,435; US 5,627,061; US 5,463,175; EP 0 218 571, sind bevorzugt, wobei die jeweils in den Patenten beschriebenen Sequenzen auch in der GenBank hinterlegt sind. Weitere Sequenzen sind beschrieben unter GenBank Accession X63374. Ferner ist das *aroA* Gen bevorzugt (*M10947 S. typhimurium aroA locus 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (aroA protein) gene*).

- das für das Glyphosat® degradierende Enzyme kodierende *gox* Gen (Glyphosatoxidoreduktase). GOX (beispielsweise die Glyphosatoxidoreduktase aus *Achromobacter* sp.) katalysiert die Spaltung einer C-N Bindung im Glyphosat, welches so zu Aminomethylphosphonsäure (AMPA) und Glyoxylat umgesetzt wird. GOX kann dadurch eine Resistenz gegen Glyphosat vermitteln (Padgett et al. (1996) *J Nutr.* 1996 Mar;126(3):702-16; Shah D et al. (1986) *Science* 233: 478-481).

- das *deh* Gen (kodierend für eine Dehalogenase, die Dalapon® inaktiviert), (GenBank Acc.-No.: AX022822, AX022820 sowie WO99/27116)

- *bxn* Gene, die für Bromoxynil® degradierende Nitrilaseenzyme kodieren. Beispielsweise die Nitrilase aus *Klebsiella ozananae*. Sequenzen sind in der GenBank beispielsweise unter den Acc.-No: E01313 (DNA encoding bromoxynil specific nitrilase) und J03196 (*K. pneumoniae* bromoxynil-specific nitrilase (*bxn*) gene, complete cds) zu finden.

- Neomycinphosphotransferasen verleihen eine Resistenz gegen Antibiotika (Aminoglykoside) wie Neomycin, G418, Hygromycin, Paromomycin oder Kanamycin, indem sie durch eine Phosphorylierungsreaktion deren inhibierende Wirkung reduzieren. Besonders bevorzugt ist das *nptII* Gen. Sequenzen können aus der GenBank erhalten werden (AF080390 Minitransposon mTn5-GNm; AF080389 Minitransposon mTn5-Nm, complete sequence). Zudem ist das Gen bereits Bestandteil zahlreicher Expressionsvektoren und kann unter Verwendung von dem Fachmann geläufigen Ver-

## 26

- fahren (wie beispielsweise Polymerasekettenreaktion) aus diesen isoliert werden (AF234316 pCAMBIA-2301; AF234315 pCAMBIA-2300, AF234314 pCAMBIA-2201). Das NPTII Gen kodiert für eine Aminoglycosid-3'O-phosphotransferase aus *E.coli*, Tn5 (GenBank Acc.-No: U00004 Position 1401-2300; Beck et al. (1982) Gene 19 327-336).
- 5
- das DOGR<sup>1</sup>-Gen. Das Gen DOGR<sup>1</sup> wurde aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* isoliert (EP 0 807 836). Es codiert für eine 2-Desoxyglukose-6-phosphat Phosphatase, die Resistenz gegenüber 2-DOG verleiht (Randez-Gil et al. 1995, Yeast 11, 1233-1240; Sanz et al. (1994) Yeast 10:1195- 1202, Sequenz: GenBank Acc.-No.: NC001140 chromosom VIII, *Saccharomyces cervisiae* Position 194799-194056).
- 10
- 15
- Sulfonylharnstoff- und Imidazolinon inaktivierende Acetolactatsynthasen, die eine Resistenz gegen Imidazolinon/Sulfonylharnstoff-Herbizide verleihen. Beispielhaft seien für Imidazolinon-Herbizide die Wirkstoffe Imazamethabenzmethyl, Imazzamox, Imazapyr, Imazaquin, Imazethapyr zu nennen. Für Sulfonylharnstoff-Herbizide seien beispielhaft Amidosulfuron, Azimsulfuron, Chlorimuronethyl, Chlorsulfuron, Cinosulfuron, Imazosulfuron, Oxasulfuron, Prosulfuron, Rimsulfuron, Sulfosulfuron zu nennen. Dem Fachmann sind zahlreiche weitere Wirkstoffe der genannten Klassen bekannt. Geeignet sind beispielsweise die unter der GenBank Acc-No.: X51514 hinterlegte Sequenz für das *Arabidopsis thaliana* Csr 1.2 Gen (EC 4.1.3.18) (Sathasivan K et al. (1990) Nucleic Acids Res. 18(8):2188). Acetolactatesynthasen die eine Resistenz gegen Imidazolinon-Herbizide verleihen sind ferner beschrieben unter den GenBank Acc.-No.:
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- a) AB049823 *Oryza sativa* ALS mRNA for acetolactate synthase, complete cds, herbicide resistant biotype
  - b) AF094326 *Bassia scoparia* herbicide resistant acetolactate synthase precursor (ALS) gene, complete cds
  - c) X07645 Tobacco acetolactate synthase gene, ALS SuRB (EC 4.1.3.18)
  - d) X07644 Tobacco acetolactate synthase gene, ALS SuRA (EC 4.1.3.18)
  - e) A19547 Synthetic nucleotide mutant acetolactate synthase
  - f) A19546 Synthetic nucleotide mutant acetolactate synthase

## 27

- g) A19545 Synthetic nucleotide mutant acetolactate synthase  
h) I05376 Sequence 5 from Patent EP 0257993  
i) I05373 Sequence 2 from Patent EP 0257993  
5 j) AL133315

Bevorzugt ist die Expression einer Acetolactatsynthase gemäß SEQ ID NO: 7, beispielsweise kodiert durch eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 6.

10

- Hygromycinphosphotransferasen (X74325 P. pseudomallei gene for hygromycin phosphotransferase) die eine Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin verleihen. Das Gen ist Bestandteil zahlreicher Expressionsvektoren und kann unter Verwendung von dem Fachmann geläufigen Verfahren (wie beispielsweise Polymerasekettenreaktion) aus diesen isoliert werden (AF294981 pINDEX4; AF234301 pCAMBIA-1380; AF234300 pCAMBIA-1304; AF234299 pCAMBIA-1303; AF234298 pCAMBIA-1302; AF354046 pCAMBIA-1305.; AF354045 pCAMBIA-1305.1)  
15  
20
- Resistenzgene gegen
- a) Chloramphenicol (Chloramphenicolacetyltransferase),  
25
- b) Tetracyclin, verschiedene Resistenzgene sind beschrieben z.B. X65876 S. ordonez genes class D tetA and tetR for tetracycline resistance and repressor proteins X51366 Bacillus cereus plasmid pBC16 tetracycline resistance gene. Zudem ist das Gen bereits Bestandteil zahlreicher Expressionsvektoren und kann unter Verwendung von dem Fachmann geläufigen Verfahren (wie beispielsweise Polymerasekettenreaktion) aus diesen isoliert werden  
30  
35
- c) Streptomycin, verschiedene Resistenzgene sind beschrieben z.B. mit der GenBank Acc.-No.:AJ278607 Corynebacterium acetoacidophilum ant gene for streptomycin adenyltransferase.  
40
- d) Zeocin, das entsprechende Resistenzgen ist Bestandteil zahlreicher Klonierungsvektoren (z.B. L36849 Cloning vector pZEO) und kann unter Verwendung von dem Fachmann geläufigen Verfahren (wie beispielsweise Polymerasekettenreaktion) aus diesen isoliert werden.  
45

5 e) Ampicillin ( $\beta$ -Lactamase Gen; Datta N, Richmond MH. (1966) Biochem J. 98(1):204-9; Heffron F et al (1975) J. Bacteriol 122: 250-256; das Amp Gen wurde zuerst zur Herstellung des E. coli Vektors pBR322 kloniert; Bolivar F et al. (1977) Gene 2:95-114). Die Sequenz ist Bestandteil zahlreicher Klonierungsvektoren und kann unter Verwendung von dem Fachmann geläufigen Verfahren (wie beispielsweise Polymerasekettenreaktion) aus diesen isoliert werden.

10

- Gene wie die Isopentenyltransferase aus *Agrobacterium tumefaciens* (strain:PO22) (Genbank Acc.-No.: AB025109). Das *ipt* Gen ist ein Schlüsselenzym der Cytokin-Biosynthese. Seine Überexpression erleichtert die Regeneration von Pflanzen (z.B. Selektion auf Cytokin-freiem Medium). Das Verfahren zur Nutzung des *ipt* Gens ist beschrieben (Ebinuma H et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 94:2117-2121; Ebinuma H et al. (2000) Selection of Marker-free transgenic plants using the oncogenes (*ipt*, *rol* A, B, C) of *Agrobacterium* as selectable markers, In Molecular Biology of Woody Plants. Kluwer Academic Publishers).

15

20

Verschiedene weitere positive Selektionsmarker, die den transformierten Pflanzen einen Wachstumsvorteil gegenüber nicht-transformierten verleihen, sowie Verfahren zu ihrer Verwendung sind u.a. beschrieben in EP-A 0 601 092. Beispielshaft sind zu nennen  $\beta$ -Glucuronidase (in Verbindung mit z.B. Cytokininglucuronid), Mannose-6-phosphat-Isomerase (in Verbindung mit Mannose), UDP-Galaktose-4-Epimerase (in Verbindung mit z.B. Galactose), wobei Mannose-6-phosphat-Isomerase in Verbindung mit Mannose besonders bevorzugt ist.

25

30

ii) Negative Selektionsmarker

35

Negative Selektionsmarker ermöglichen beispielsweise die Selektion von Organismen mit erfolgreich deletierten Sequenzen, die das Markergen umfassen (Koprek T et al. (1999) The Plant Journal 19(6):719-726). Bei der negativen Selektion wird beispielsweise durch den in die Pflanze eingebrachten negativen Selektionsmarker eine Verbindung, die ansonsten für die Pflanze keine nachteilige Wirkung hat, in eine Verbindung mit nachteiliger Wirkung umgesetzt. Ferner sind Gene geeignet, die per se eine nachteilige Wirkung haben, wie zum Beispiel TK thymidine kinase (TK), Diphtheria Toxin A Fragment (DT-A), das *codA* Genprodukt kodierend für eine Cytosindeaminase (Gleave AP et al. (1999) Plant Mol Biol. 40(2):223-35; Perera

40

45

RJ et al. (1993) Plant Mol Biol 23(4): 793-799; Stougaard J; (1993) Plant J 3:755-761), das Cytochrom P450 Gen (Koprek et al. (1999) Plant J 16:719-726), Gene kodierend für eine Haloalkan Dehalogenase (Naested H (1999) Plant J. 18:571-576),  
5 das *iaaH* Gen (Sundaresan V et al. (1995) Genes & Development 9:1797-1810) oder das *tms2* Gen (Fedoroff NV & Smith DL 1993, Plant J 3: 273-289).

Die jeweils für die Selektion verwendeten Konzentrationen der  
10 Antibiotika, Herbizide, Biozide oder Toxine müssen an die jeweiligen Testbedingungen bzw. Organismen angepasst werden. Beispielfhaft seien für Pflanzen zu nennen Kanamycin (Km) 50 mg/l, Hygromycin B 40 mg/l, Phosphinothricin (Ppt) 6 mg/l.

15 Ferner können funktionelle Analoga der genannten Nukleinsäuren kodierend für Selektionsmarker exprimiert werden. Funktionelle Analoga meint hier all die Sequenzen, die im wesentlichen die gleiche Funktion haben d.h. zu einer Selektion transformierter Organismen befähigt sind. Dabei  
20 kann das funktionelle Analogon sich in anderen Merkmalen durchaus unterscheiden. Es kann zum Beispiel eine höhere oder niedrigere Aktivität haben oder auch über weitere Funktionalitäten verfügen.

25 2. Verbesserter Schutz der Pflanze gegen abiotische Stressfaktoren wie Trockenheit, Hitze, oder Kälte zum Beispiel durch Überexpression von "antifreeze"-Polypeptiden aus *Myoxocephalus Scorpius* (WO 00/00512), *Myoxocephalus octodecemspinosus*, dem *Arabidopsis thaliana* Transkriptionsaktivator CBF1, Glutamatdehydrogenasen (WO 97/12983,  
30 WO 98/11240), Calcium-abhängigen Proteinkinasegenen (WO 98/26045), Calcineurinen (WO 99/05902), Farnesyltransferasen (WO 99/06580), Pei ZM et al., Science 1998, 282: 287-290), Ferritin (Deak M et al., Nature Biotechnology 1999,  
35 17:192-196), Oxalatoxidase (WO 99/04013; Dunwell JM Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 1998, 15:1-32), DREB1A-Faktor (dehydration response element B 1A; Kasuga M et al., Nature Biotechnology 1999, 17:276-286), Genen der Mannitol- oder Trehalosesynthese wie der Trehalosephosphat-synthase oder der Trehalosephosphatphosphatase (WO 97/42326),  
40 oder durch Inhibition von Genen wie der Trehalase (WO 97/50561). Besonders bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für den transkriptionellen Aktivator CBF1 aus *Arabidopsis thaliana* (GenBank Acc.-No.: U77378) oder das "antifreeze protein" aus *Myoxocephalus octodecemspinosus* (GenBank  
45

Acc.-No.: AF306348) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.

3. Expression von Stoffwechselenzymen zur Verwendung im Futter-  
5 und Nahrungsmittelbereich, zum Beispiel die Expression von Phytase und Cellulasen. Besonders bevorzugt sind Nukleinsäuren wie die künstliche für eine mikrobielle Phytase kodierende cDNA (GenBank Acc.-No.: A19451) oder funktionelle Äquivalente derselben.
- 10 4. Erreichen einer Resistenz zum Beispiel gegen Pilze, Insekten, Nematoden und Krankheiten durch gezielte Absonderung oder Anreicherung bestimmter Metaboliten oder Proteine in der Epidermis des Embryos. Beispielhaft seien genannt Glucosinolate  
15 (Abwehr von Herbivoren), Chitinasen oder Glucanasen und andere Enzyme die die Zellwand von Parasiten zerstören, Ribosom-inaktivierende Proteine (RIPs) und andere Proteine der pflanzlichen Resistenz- und Stressreaktion, wie sie bei Verletzung oder mikrobiellem Befall von Pflanzen oder chemisch  
20 durch zum Beispiel Salicylsäure, Jasmonsäure oder Ethylen induziert werden, Lysozyme aus nicht-pflanzlichen Quellen wie zum Beispiel T4 Lysozym oder Lysozym aus verschiedenen Säugern, insektizide Proteine wie *Bacillus thuringiensis* Endotoxin,  $\alpha$ -Amylaseinhibitor oder Proteaseinhibitoren (cowpea  
25 Trypsininhibitor), Glucanasen, Lectine wie Phytohemagglutinin, Schneeglöckchenlectin, Weizenkeimagglutinin, RNAsen oder Ribozyme. Besonders bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für die chit42 Endochitinase aus *Trichoderma harzianum* (GenBank Acc.-No.: S78423) oder für das N-hydroxylierende, multi-  
30 funktionelle Cytochrom P-450 (CYP79) Protein aus *Sorghum bicolor* (GenBank Acc.-No.: U32624) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.

Bekannt ist die Akkumulation von Glucosinolaten in Pflanzen  
35 der Gattung der Cardales insbesondere der Ölsaaten zum Schutz vor Schädlingen (Rask L et al.(2000) Plant Mol Biol 42:93-113; Menard R et al. (1999) Phytochemistry 52:29-35), die Expression des *Bacillus thuringiensis* Endotoxin unter Kontrolle des 35 S CaMV Promotors (Vaeck et al. (1987) Nature  
40 328:33-37) oder der Schutz des Tabaks gegen Pilzbefall durch Expression einer Chitinase aus der Bohne unter Kontrolle des CaMV Promotors (Broglie et al. (1991) Science 254:1194-1197).

Durch Expression des Lectins Agglutinin aus Schneeglöckchen  
45 (*Galanthus nivalis*) kann eine Resistenz gegen Schädlinge wie den Reisschädling *Nilaparvata lugens* beispielsweise in transgenen Reispflanzen erreicht werden (Rao et al. (1998) Plant

J. 15(4):469-77.). *Nilaparvata lugens* zählt zu den Phloem-saugenden Schädlingen und fungiert darüberhinaus als Über-träger bedeutender Virus-bedingter Pflanzenkrankheiten.

- 5 Die Expression synthetischer cryIA(b) and cryIA(c) Gene, die für Lepidopteren-spezifische delta-Endotoxine aus *Bacillus thuringiensis* kodieren, kann in verschiedenen Pflanzen eine Resistenz gegen Schadinsekten bewirken. So kann in Reis eine Resistenz gegen zwei der wichtigsten Reisschädlinge, den gestreiften Stengelbohrrer (*Chilo suppressalis*) und den gelben Stengelbohrrer (*Scirpophaga incertulas*), erzielt werden (Cheng X et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(6):2767-2772; Nayak P et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(6):2111-2116).
- 10
- 15 5. Expression von Genen, die eine Akkumulation von Fein-chemikalien, wie von Tocopherolen, Tocotrienolen oder Carotinoiden bewirken. Beispielfhaft sei die Phytoendesaturase genannt. Bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für die Phytoendesaturase aus *Narcissus pseudonarcissus* (GenBank Acc.-No.: X78815) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.
- 20
6. Produktion von Nutraceuticals wie zum Beispiel polyungesättigten Fettsäuren wie beispielsweise Arachidonsäure oder EP (Eicosapentaensäure) oder DHA (Docosahexaensäure) durch Expression von Fettsäureelongasen und/oder -desaturasen oder Produktion von Proteinen mit verbessertem Nahrungswert wie zum Beispiel mit einem hohen Anteil an essentiellen Aminosäuren (z.B. das methioninreiche 2S Albumingen der Brasilnuss). Bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für das methioninreiche 2S Albumin aus *Bertholletia excelsa* (GenBank Acc.-No.:AB044391), die  $\Delta 6$ -Acyllipiddesaturase aus *Physcomitrella patens* (GenBank Acc.-No.: AJ222980; Girke et al 1998, The Plant Journal 15:39-48), die  $\Delta 6$ -Desaturase aus *Mortierella alpina* (Sakuradani et al 1999 Gene 238:445-453), die  $\Delta 5$ -Desaturase aus *Caenorhabditis elegans* (Michaelson et al. 1998, FEBS Letters 439:215-218), die  $\Delta 5$ -Fettsäuredesaturase (des-5) aus *Caenorhabditis elegans* (GenBank Acc.-No.: AF078796), die  $\Delta 5$ -Desaturase aus *Mortierella alpina* (Michaelson et al. JBC 273:19055 - 19059), die  $\Delta 6$ -Elongase aus *Caenorhabditis elegans* (Beaudoin et al. 2000, PNAS 97:6421-6426), die  $\Delta 6$ -Elongase aus *Physcomitrella patens* (Zank et al. 2000, Biochemical Society Transactions 28:654-657) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45 7. Produktion von Feinchemikalien (wie beispielsweise Enzymen) und Pharmazeutika (wie zum Beispiel Antikörpern oder Vakzinen wie beschrieben bei Hood EE, Jilka JM. (1999) Curr Opin Bio-

- technol. 10(4):382-6; Ma JK, Vine ND (1999) Curr Top Microbiol Immunol 236:275-92). Beispielsweise konnte rekombinantes Avidin aus Hühnereiweiß und bakterieller  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) in großen Maßstab in transgenen Maispflanzen produziert werden (Hood et al. (1999) Adv Exp Med Biol 464:127-47. Review.). Diese rekombinanten Proteine aus Maispflanzen werden von der Firma Sigma (Sigma Chemicals Co.) als hochreine Biochemikalien vertrieben.
- 5
- 10 8. Erreichen einer erhöhten Speicherfähigkeit in Zellen, die normalerweise weniger Speicherproteine oder -lipide enthalten mit dem Ziel, den Ertrag an diesen Substanzen zu erhöhen, zum Beispiel durch Expression einer Acetyl-CoA Carboxylase. Bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für die Acetyl-CoA Carboxylase
- 15 (Accase) aus *Medicago sativa* (GenBank Acc.-No.: L25042) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.

Weitere Beispiele für vorteilhafte Gene sind zum Beispiel genannt bei Dunwell JM, Transgenic approaches to crop improvement, J Exp Bot. 2000;51 Spec No; Seite 487-96.

20

- Ferner können funktionelle Analoga der genannten Nukleinsäuren bzw. Proteine exprimiert werden. Funktionelle Analoga meint hier all die Sequenzen, die im wesentlichen die gleiche Funktion haben d.h. zu der Funktion (zum Beispiel einer Substratumsetzung oder einer Signaltransduktion) befähigt sind wie auch das beispielhaft genannte Protein. Dabei kann das funktionelle Analogon sich in anderen Merkmalen durchaus unterscheiden. Es kann zum Beispiel eine höhere oder niedrigere Aktivität haben oder auch über
- 25 weitere Funktionalitäten verfügen. Funktionelle Analoga meint ferner Sequenzen, die für Fusionsproteine bestehend aus einem der bevorzugten Proteine und anderen Proteinen zum Beispiel einem weiteren bevorzugten Protein oder aber auch einer Signalpeptidsequenz kodieren.
- 30

- 35 Die Expression der Nukleinsäuren unter Kontrolle der Erfindungsgemäßen Promotoren ist in jedem gewünschten Zellkompartiment, wie z.B. dem Endomembransystem, der Vakuole und den Chloroplasten möglich. Durch Nutzung des sekretorischen Weges sind gewünschte
- 40 Glykosylierungsreaktionen, besondere Faltungen u.ä. möglich. Auch die Sekretion des Zielproteins zur Zelloberfläche bzw. die Sezernierung ins Kulturmedium, beispielsweise bei Nutzung suspensionskultivierter Zellen oder Protoplasten ist möglich. Die dafür notwendigen Targetsequenzen können sowohl in einzelnen
- 45 Vektorvariationen berücksichtigt werden als auch durch Verwendung einer geeigneten Klonierungsstrategie gemeinsam mit dem zu klonierenden Zielgen in den Vektor mit eingebracht werden. Als

## 33

Targetsequenzen können sowohl geneigene, sofern vorhanden, oder heterologe Sequenzen genutzt werden. Zusätzliche, heterologe zur funktionellen Verknüpfung bevorzugte aber nicht darauf beschränkte Sequenzen sind weitere Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, in Mitochondrien, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten; sowie Translationsverstärker wie die 5'-Leadersequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693-8711) und dergleichen. Das Verfahren, an sich nicht in den Plastiden lokalisierte Proteine, gezielt in die Plastiden zu transportieren, ist beschrieben (Klosgen RB und Weil JH (1991) Mol Gen Genet 225(2):297-304; Van Breusegem F et al. (1998) Plant Mol Biol 38(3):491-496). Bevorzugte Sequenzen sind:

- a) kleine Untereinheit (SSU) der Ribulosebisphosphatcarboxylase (Rubisco ssu) aus Erbse, Mais, Sonnenblume
- b) Transitpeptide abgeleitet von Genen der pflanzlichen Fettsäurebiosynthese wie das Transitpeptid des plastidären "Acyl Carrier Protein" (ACP), die Stearyl-ACP-Desaturase,  $\beta$ -Ketoacyl-ACP Synthase oder die Acyl-ACP-Thioesterase.
- c) das Transitpeptid für GBSSI ("Granule Bound Starch Synthase I")
- d) LHCP II Gene.

Die Zielsequenzen können mit anderen, von dem Transitpeptid kodierenden Sequenzen verschiedenen, Targeting-Sequenzen verknüpft sein, um eine subzelluläre Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten zu gewährleisten. Ferner können Translationsverstärker wie die 5'-Leadersequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al. (1987) Nucl Acids Res 15:8693-8711) und dergleichen zum Einsatz kommen.

Dem Fachmann ist ferner bekannt, dass er die oben beschriebenen Gene nicht direkt unter Verwendung der für diese Gene kodierenden Nukleinsäuresequenzen exprimieren oder zum Beispiel durch antisense reprimieren muss. Er kann auch zum Beispiel künstliche Transkriptionsfaktoren vom Typ der Zinkfingerproteine verwenden (Beerli RR et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97(4):1495-500). Diese Faktoren lagern sich in den regulatorischen Bereichen der zu exprimierenden oder zu reprimierenden endogenen Gene an und bewirken, je nach Gestaltung des Faktors, eine Expression oder

## 34

Repression des endogenen Gens. So kann man die gewünschten Effekte auch durch Expression eines entsprechenden Zinkfinger-Transkriptionsfaktors unter Kontrolle eines der erfindungsgemäßen Promotoren erreichen.

5

Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten können ebenso zur Unterdrückung bzw. Reduktion von Replikation oder/und Translation von Targetgenen durch "gene silencing" eingesetzt werden.

10 Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten können auch eingesetzt werden, um Nukleinsäuren zu exprimieren, die sogenannte "anti-sense" Effekte vermitteln und so beispielsweise zur Verminderung der Expression eines Zielproteins befähigt sind.

15 Bevorzugte Gene bzw. Proteine, deren Suppression einen vorteilhaften Phänotyp bedingt, umfassen beispielhaft, aber nicht einschränkend:

a) Polygalakturonase zur Verhinderung von Zellabbau und  
20 "Matschig"-werden von Pflanzen und Früchten beispielsweise Tomaten. Bevorzugt werden dazu Nukleinsäuresequenzen wie die des Polygalakturonase-Gens der Tomate (GenBank Acc.-No.: X14074) oder dessen Homologe aus anderen Gattungen und Arten verwendet.

25

b) Verminderung der Expression von allergenen Proteinen wie beispielsweise beschrieben bei Tada Y et al. (1996) FEBS Lett 391(3):341-345 oder Nakamura R (1996) Biosci Biotechnol Biochem 60(8):1215-1221.

30

c) Veränderung der Blütenfarbe durch Suppression der Expression von Enzymen der Anthocyanbiosynthese. Entsprechende Vorgehensweisen sind beschrieben (beispielsweise bei Forkmann G, Martens S. (2001) Curr Opin Biotechnol 12(2):155-160). Bevorzugt werden dazu Nukleinsäuresequenzen wie die der Flavonoid-3'-hydroxylase (GenBank Acc.-No.: AB045593), der Dihydroflavanol-4-reduktase (GenBank Acc.-No.: AF017451), der Chalconisomerase (GenBank Acc.-No.: AF276302), der Chalcon-synthase (GenBank Acc.-No.: AB061022), der Flavanone-3-beta-hydroxylase (GenBank Acc.-No.: X72592) oder der Flavone-synthase II (GenBank Acc.-No.: AB045592) oder deren Homologe  
35  
40 aus anderen Gattungen und Arten verwendet.

d) Verschiebung des Amylose/Amylopektingehaltes in Stärke durch  
45 Suppression des Verzweigungsenzyms Q, das für die  $\alpha$ -1,6-glykosidische Verknüpfung verantwortlich ist. Entsprechende Vorgehensweisen sind beschrieben (beispielsweise bei Schwall

## 35

GP et al. (2000) Nat Biotechnol 18(5):551-554). Bevorzugt werden dazu Nukleinsäuresequenzen wie die des Starch branching enzyme II der Kartoffel (GenBank Acc.-No.: AR123356; US 6,169,226) oder dessen Homologe aus anderen Gattungen und  
5 Arten verwendet.

Eine "antisense" Nukleinsäure meint zunächst eine Nukleinsäuresequenz die ganz oder teilweise zu zumindest einem Teil des "sense"-Stranges besagten Zielproteins komplementär ist. Dem  
10 Fachmann ist bekannt, dass er alternativ die cDNA oder das korrespondierende Gen als Ausgangsmatrize für entsprechende antisense-Konstrukte verwenden kann. Bevorzugt ist die "antisense" Nukleinsäure komplementär zu dem kodierenden Bereich des Zielproteins oder einem Teil desselben. Die "antisense" Nukleinsäure  
15 kann aber auch zu der nicht-kodierenden Region oder einem Teil derselben komplementär sein. Ausgehend von der Sequenzinformation zu einem Zielprotein, kann eine antisense Nukleinsäure unter Berücksichtigung der Basenpaarregeln von Watson und Crick in der dem Fachmann geläufigen Weise entworfen werden. Eine antisense  
20 Nukleinsäure kann komplementär zu der gesamten oder einem Teil der Nukleinsäuresequenz eines Zielproteins sein. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die antisense Nukleinsäure ein Oligonukleotid mit einer Länge von zum Beispiel 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 Nukleotiden.

25 Die antisense Nukleinsäure umfasst in einer bevorzugten Ausführungsform  $\alpha$ -anomere Nukleinsäuremoleküle.  $\alpha$ -Anomere Nukleinsäuremoleküle bilden besondere doppelsträngige Hybride mit komplementärer RNA in denen im Unterschied zu den normalen  
30  $\beta$ -Einheiten die Stränge parallel zu einander verlaufen (Gaultier et al. (1987) Nucleic Acids. Res. 15:6625-6641).

Ebenso umfasst ist die Verwendung der oben beschriebenen Sequenzen in sense-Orientierung, was wie dem Fachmann geläufig  
35 ist, zu einer Kosuppression führen kann. In Tabak, Tomate und Petunie ist demonstriert worden, dass die Expression von sense-RNA zu einem endogenen Gen, die Expression desselben vermindern oder ausschalten kann, ähnlich wie es für antisense Ansätze beschrieben wurde (Goring et al. (1991) Proc. Natl Acad Sci USA,  
40 88:1770-1774; Smith et al. (1990) Mol Gen Genet 224:447-481; Napoli et al. (1990) Plant Cell 2:279-289; Van der Krol et al. (1990) Plant Cell 2:291-299). Dabei kann das eingeführte Konstrukt das zu vermindernde Gen ganz oder nur teilweise repräsentieren. Die Möglichkeit zur Translation ist nicht erforderlich.

45

## 36

Ganz besonders bevorzugt ist auch die Verwendung von Verfahren wie der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA ("double-stranded RNA interference"). Entsprechende Verfahren sind dem Fachmann bekannt und im Detail beschrieben (z.B. Matzke MA et al. 5 (2000) Plant Mol Biol 43:401-415; Fire A. et al (1998) Nature 391:806-811; WO 99/32619; WO 99/53050; WO 00/68374; WO 00/44914; WO 00/44895; WO 00/49035; WO 00/63364). Auf die in den angegebenen Zitaten beschriebenen Verfahren und Methoden wird ausdrücklich Bezug genommen. Hier wird durch gleichzeitige Einbringung 10 von Strang- und Gegenstrang eine hocheffiziente Unterdrückung nativer Gene bewirkt.

Vorteilhaft kann die antisense-Strategie mit einem Ribozym-Verfahren gekoppelt werden. Ribozyme sind katalytisch aktive RNA 15 Sequenzen, die gekoppelt an die antisense Sequenzen, die Zielsequenzen katalytisch spalten (Tanner NK. FEMS Microbiol Rev. 1999; 23 (3):257-75). Dies kann die Effizienz einer anti-sense Strategie erhöhen. Die Expression von Ribozymen zur Verminderung bestimmter Proteine ist dem Fachmann bekannt und beispielsweise 20 wie beschrieben in EP-A1 0 291 533, EP-A1 0 321 201 und EP-A1 0 360 257. Geeignete Zielsequenzen und Ribozyme können zum Beispiel wie bei Steinecke (Ribozymes, Methods in Cell Biology 50, Galbraith et al eds Academic Press, Inc. (1995), 449-460) beschrieben, durch Sekundärstrukturberechnungen von Ribozym- und 25 Ziel-RNA sowie durch deren Interaktion bestimmt werden (Bayley CC et al., Plant Mol Biol. 1992; 18(2):353-361; Lloyd AM and Davis RW et al., Mol Gen Genet. 1994 Mar;242(6):653-657). Beispielfhaft sind "hammerhead"-Ribozyme zu nennen (Haselhoff and Gerlach (1988) Nature 334:585-591). Bevorzugte Ribozyme basieren auf De- 30 rivaten der Tetrahymena L-19 IVS RNA (US 4,987,071; US 5,116,742). Weitere Ribozyme mit Selektivität für eine L119 mRNA können selektioniert werden (Bartel D und Szostak JW (1993) Science 261:1411-1418).

35 In einer weiteren Ausführungsform kann Verminderung der Zielprotein-Expression unter Verwendung von Nukleinsäuresequenzen bewirkt werden, die komplementär zu regulativen Elementen der Zielprotein-Gene sind, mit diesen eine triple-helikale Struktur ausbilden und so die Gen-Transkription verhindern (Helene C (1991) 40 Anticancer Drug Des. 6(6):569-84; Helene C et al. (1992) Ann NY Acad Sci 660:27-36; Maher LJ (1992) Bioassays 14(12):807-815).

Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten und die von ihnen abgeleiteten Vektoren können weitere Funktionselemente enthalten.

## 37

Der Begriff Funktionselement ist breit zu verstehen und meint all solche Elemente, die einen Einfluss auf Herstellung, Vermehrung oder Funktion der erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder von diesen abgeleitete Vektoren oder Organismen haben. Beispielhaft  
5 aber nicht einschränkend seien zu nennen:

- a) Reportergene, die für leicht quantifizierbare Proteine kodieren und über Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine Bewertung der Transformationseffizienz, des Expressionsortes  
10 oder -zeitpunktes gewährleisten. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Gene kodierend für Reporter-Proteine (siehe auch Schenborn E, Groskreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) wie
- 15 - "green fluorescence protein" (GFP) (Chui WL et al., Curr Biol 1996, 6:325-330; Leffel SM et al., Biotechniques. 23(5):912-8, 1997; Sheen et al.(1995) Plant Journal 8(5):777-784; Haseloff et al.(1997) Proc Natl Acad Sci  
20 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).
- Chloramphenicoltransferase (Fromm et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5824-5828),  
25
- Luziferase (Millar et al., Plant Mol Biol Rep 1992 10:324-414; Ow et al. (1986) Science, 234:856-859); erlaubt Biolumineszenzdetektion.
- 30 -  $\beta$ -Galactosidase, kodiert für ein Enzym für das verschiedenen chromogene Substrate zur Verfügung stehen.
- $\beta$ -Glucuronidase (GUS) (Jefferson et al., EMBO J. 1987, 6, 3901-3907) oder das uidA Gen, das ein Enzym für ver-  
35 schiedene chromogene Substrate kodiert.
- R-Locus Genprodukt:Protein, das die Produktion von Anthocyaninpigmenten (rote Färbung) in pflanzlichen Gewebe reguliert und so eine direkte Analyse der Promotor-  
40 aktivität 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).

## 38

- $\beta$ -Lactamase (Sutcliffe (1978) Proc Natl Acad Sci USA 75:3737-3741), Enzym für verschiedene chromogene Substrate (z.B. PADAC, eine chromogenes Cephalosporin).
- 5     - xylE Genprodukt (Zukowsky et al. (1983) Proc Natl Acad Sci USA 80:1101-1105), Catecholdioxygenase, die chromogene Catechole umsetzen kann.
- Alpha-Amylase (Ikuta et al. (1990) Biotechnol 8:241-242).
- 10    - Tyrosinase (Katz et al. (1983) J Gen Microbiol 129:2703-2714), Enzym, das Tyrosin zu DOPA und Dopaquinon oxidiert, die infolge das leicht nachweisbare Melanin bilden.
- 15    - Aequorin (Prasher et al. (1985) Biochem Biophys Res Commun 126(3):1259-1268), kann in der Calcium-sensitiven Biolumineszenzdetektion verwendet werden.
- 20 b) 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 et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).
- 25     c) Elemente zum Beispiel "Bordersequenzen", die einen Agrobakterien-vermittelten Transfer in Pflanzenzellen für die Übertragung und Integration ins Pflanzengenom ermöglichen, wie zum Beispiel die rechte oder linke Begrenzung der T-DNA oder die vir-Region.
- 30     d) Multiple Klonierungsregionen (MCS) erlauben und erleichtern die Insertion eines oder mehrerer Nukleinsäuresequenzen.
- 35

Dem Fachmann sind verschiedene Wege bekannt, um zu einer erfindungsgemäßen Expressionskassette zu gelangen. Die Herstellung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette erfolgt beispielsweise durch Fusion eines der erfindungsgemäßen Promotoren (oder eines funktionellen Äquivalentes oder funktionell äquivalenten Teils gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 oder eines funktionellen Äquivalentes mit einer zu exprimierenden Nukleotidsequenz, gegebenenfalls einer für ein Transitpeptid kodierenden Sequenz, vorzugsweise ein chloroplastenspezifisches Transitpeptid, welches vorzugsweise zwischen dem Promotor und der jeweiligen Nukleotidsequenz angeordnet ist, sowie einem Terminator- oder Poly-

adenylierungssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in Maniatis T, Fritsch EF und Sambrook J, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY

- 5 (1989) sowie in Silhavy TJ, Berman ML und Enquist LW, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel FM et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience beschrieben sind.

10

Unter einer Expressionskassette sind aber auch solche Konstruktionen zu verstehen, bei denen der Promotor, ohne dass er zuvor mit einer zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpft wurde, zum Beispiel über eine gezielte homologe Rekombina-

- 15 tion oder eine zufällige Insertion in ein Wirtsgenom eingeführt wird, dort regulatorische Kontrolle über mit ihm dann funktionell verknüpfte Nukleinsäuresequenzen übernimmt und die transgene Expression derselben steuert. Durch Insertion des Promotors - zum Beispiel durch eine homologe Rekombination - vor eine für ein  
20 bestimmtes Polypeptid kodierende Nukleinsäure erhält man eine erfindungsgemäße Expressionskassette, die die Expression des bestimmten Polypeptides in der Pflanze steuert. Ferner kann die Insertion des Promotors auch derart erfolgen, dass antisense-RNA zu der für ein bestimmtes Polypeptid kodierenden Nukleinsäure  
25 exprimiert wird. Damit wird die Expression des bestimmten Polypeptides in Pflanzen herunterreguliert oder ausgeschaltet.

Analog kann auch eine transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz zum Beispiel durch eine homologe Rekombination hinter den  
30 endogenen, natürlichen Promotor plaziert werden, wodurch man eine erfindungsgemäße Expressionskassette erhält, die die Expression der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz in den Keimblättern des pflanzlichen Embryos steuert.

- 35 Erfindungsgemäß sind ferner Vektoren, die die oben beschriebenen Expressionskassetten enthalten. Vektoren können beispielhaft Plasmide, Cosmide, Phagen, Viren oder auch Agrobakterien sein.

Ein anderer Gegenstand der Erfindung betrifft transgene

- 40 Organismen, transformiert mit wenigstens einer erfindungsgemäßen Expressionskassette oder einem erfindungsgemäßen Vektor, sowie Zellen, Zellkulturen, Gewebe, Teile - wie zum Beispiel bei pflanzlichen Organismen Blätter, Wurzeln usw. - oder Vermehrungsgut abgeleitet von solchen Organismen.

45

## 40

Unter Organismus, Ausgangs- oder Wirtsorganismen werden prokaryotische oder eukaryotische Organismen, wie beispielsweise Mikroorganismen oder pflanzliche Organismen verstanden. Bevorzugte Mikroorganismen sind Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze.

5

Bevorzugte Bakterien sind Bakterien der Gattung *Escherichia*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* oder Cyanobakterien zum Beispiel der Gattung *Synechocystis*.

- 10 Bevorzugt sind vor allem Mikroorganismen, welche zur Infektion von Pflanzen und damit zur Übertragung der erfindungsgemäßen Kassetten befähigt sind. Bevorzugte Mikroorganismen sind solche aus der Gattung *Agrobacterium* und insbesondere der Art *Agrobacterium tumefaciens*.

15

Bevorzugte Hefen sind *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula* oder *Pichia*.

Bevorzugte Pilze sind *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*,

- 20 *Neurospora*, *Fusarium*, *Beauveria* oder weitere in Indian Chem Engr. Section B. Vol 37, No 1,2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 beschriebene Pilze.

Als transgene Organismen bevorzugte Wirts- oder Ausgangs-

- 25 organismen sind vor allem Pflanzen. Eingeschlossen sind im Rahmen der Erfindung alle Gattungen und Arten höherer und niedrigerer Pflanzen des Pflanzenreiches. Eingeschlossen sind ferner die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprossen und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut und Kulturen, zum Beispiel
- 30 Zellkulturen. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium.

Einjährige, mehrjährige, monocotyledone und dicotyledone Pflanzen

- 35 sind bevorzugte Wirtsorganismen für die Herstellung transgener Pflanzen. Die Expression von Genen ist ferner vorteilhaft bei allen Schmuckpflanzen, Nutz- oder Zierbäumen, Blumen, Schnittblumen, Sträuchern oder Rasen. Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen Angiospermen, Bryophyten wie zum Beispiel
- 40 *Hepaticae* (Leberblümchen) und *Musci* (Moose); Pteridophyten wie Farne, Schachtelhalm und Lycopoden; Gymnospermen wie Koniferen, Cycaden, Ginkgo und Gnetales; Algen wie Chlorophyceae, Phaeophyceae, Rhodophyceae, Myxophyceae, Xanthophyceae, Bacillariophyceae (Diatomeen) und Euglenophyceae.

45

## 41

Bevorzugt sind Pflanzen nachfolgender Pflanzenfamilien:

- Amaranthaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Carophyllaceae,  
Chenopodiaceae, Compositae, Cruciferae, Cucurbitaceae, Labiatae,  
Leguminosae, Papilionoideae, Liliaceae, Linaceae, Malvaceae,  
5 Rosaceae, Rubiaceae, Saxifragaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae,  
Sterculiaceae, Tetragoniaceae, Theaceae, Umbelliferae.

- Bevorzugte monokotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus  
den monokotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel der Familie der  
10 Gramineae wie Reis, Mais, Weizen oder andere Getreidearten wie  
Gerste, Hirse, Roggen, Triticale oder Hafer sowie dem Zuckerrohr  
sowie alle Arten von Gräsern.

- Bevorzugte dikotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus den  
15 dikotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel

- Asteraceae wie Sonnenblume, Tagetes oder Calendula und andere  
mehr,
- 20 - Compositae, besonders die Gattung Lactuca, ganz besonders die  
Art sativa (Salat) und andere mehr,
- Cruciferae, besonders die Gattung Brassica, ganz besonders  
die Arten napus (Raps), campestris (Rübe), oleracea cv Tastie  
25 (Kohl), oleracea cv Snowball Y (Blumenkohl) und oleracea cv  
Emperor (Broccoli) und weitere Kohllarten; und der Gattung  
Arabidopsis, ganz besonders die Art thaliana sowie Kresse  
oder Canola und andere mehr,
- 30 - Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis oder Zucchini und andere mehr,
- Leguminosae besonders die Gattung Glycine, ganz besonders die  
Art max (Sojabohne) Soja sowie Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen  
oder Erdnuss und andere mehr
- 35 - Rubiaceae, bevorzugt der Unterklasse Lamiidae wie beispiels-  
weise Coffea arabica oder Coffea liberica (Kaffestrauch) und  
andere mehr,
- 40 - Solanaceae besonders die Gattung Lycopersicon, ganz besonders  
die Art esculentum (Tomate) und die Gattung Solanum, ganz be-  
sonders die Art tuberosum (Kartoffel) und melongena (Aubergine)  
sowie Tabak oder Paprika und andere mehr,
- 45 - Sterculiaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie bei-  
spielsweise Theobroma cacao (Kakaostrauch) und andere mehr,

## 42

- Theaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise *Camellia sinensis* oder *Thea sinensis* (Teestrauch) und andere mehr,
- 5 - Umbelliferae, besonders die Gattung *Daucus* (ganz besonders die Art *carota* (Karotte) und *Apium* (ganz besonders die Art *graveolens dulce* (Selderie) und andere mehr; und die Gattung *Capsicum*, ganz besonders die Art *annuum* (Pfeffer) und andere mehr,
- 10 sowie Lein, Soja, Baumwolle, Hanf, Flachs, Gurke, Spinat, Möhre, Zuckerrübe und den verschiedenen Baum-, Nuss- und Weinarten, insbesondere Banane und Kiwi.
- 15 Umfasst sind ferner Schmuckpflanzen, Nutz- oder Zierbäumen, Blumen, Schnittblumen, Sträuchern oder Rasen. Beispielsweise aber nicht einschränkend seien zu nennen Angiospermen, Bryophyten wie zum Beispiel Hepaticae (Leberblümchen) und Musci (Moose); Pteridophyten wie Farne, Schachtelhalm und Lycopoden; Gymno-
- 20 spermen wie Koniferen, Cycaden, Ginkgo und Gnetales, die Familien der Rosaceae wie Rose, Ericaceae wie Rhododendrons und Azaleen, Euphorbiaceae wie Weihnachtssterne und Kroton, Caryophyllaceae wie Nelken, Solanaceae wie Petunien, Gesneriaceae wie das Usambaraveilchen, Balsaminaceae wie das Springkraut, Orchidaceae
- 25 wie Orchideen, Iridaceae wie Gladiolen, Iris, Freesie und Krokus, Compositae wie Ringelblume, Geraniaceae wie Geranien, Liliaceae wie der Drachenbaum, Moraceae wie Ficus, Araceae wie Philodendron und andere mehr.
- 30 Am meisten bevorzugt sind *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Tagetes erecta*, *Calendula officinalis* und *Brassica napus* sowie alle Gattungen und Arten, die als Nahrungs- oder Futtermittel zum Einsatz kommen, wie die beschriebenen Getreidearten, oder sich zur Herstellung von Ölen eignen, wie Ölsaaten (wie zum
- 35 Beispiel Raps), Nussarten, Soja, Sonnenblume, Kürbis und Erdnuss.
- Pflanzliche Organismen im Sinne der Erfindung sind weiterhin weitere photosynthetisch aktive befähigte Organismen, wie zum Beispiel Algen oder Cyanobakterien, sowie Moose.
- 40 Bevorzugte Algen sind Grünalgen, wie beispielsweise Algen der Gattung *Haematococcus*, *Phaedactylum tricornatum*, *Volvax* oder *Dunaliella*.
- 45 Die Herstellung eines transformierten Organismus oder einer transformierten Zelle erfordert, dass die entsprechende DNA in die entsprechende Wirtszelle eingebracht wird. Für diesen Vor-

## 43

gang, der als Transformation bezeichnet wird, steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung (siehe auch Keown et al. 1990 Methods in Enzymology 185:527-537). So kann die DNA beispielhaft direkt durch Mikroinjektion oder durch Bombardierung mit DNA-beladenen Mikropartikeln eingeführt werden. Auch kann die Zelle chemisch, zum Beispiel mit Polyethylenglycol, 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 Liposomen erfolgen. Elektroporation ist eine weitere geeignete Methode zur Einführung von DNA, bei der die Zellen reversibel durch einen elektrischen Impuls permeabilisiert werden.

Bei Pflanzen werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben 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 Lösung und die Mikroinjektion.

Neben diesen "direkten" Transformationstechniken kann eine Transformation auch durch bakterielle Infektion mittels *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* durchgeführt werden. Diese Stämme enthalten ein Plasmid (Ti bzw. Ri Plasmid), das auf die Pflanze nach *Agrobacterium*-Infektion übertragen wird. Ein Teil dieses Plasmids, genannt T-DNA (transferred DNA), wird in das Genom der Pflanzenzelle integriert.

Die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation ist am besten für dicotyledone, diploide Pflanzenzellen geeignet, wohingegen die direkten Transformationstechniken sich für jeden Zelltyp eignen.

Die Einführung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette in Zellen, bevorzugt in pflanzliche Zellen, kann vorteilhaft unter Verwendung von Vektoren realisiert werden.

In einer vorteilhaften Ausführungsform wird die Einführung der Expressionskassette mittels Plasmidvektoren realisiert. Bevorzugt sind solche Vektoren, die eine stabile Integration der Expressionskassette in das Wirtsgenom ermöglichen.

Im Falle von Injektion oder Elektroporation von DNA in pflanzliche Zellen sind keine besonderen Anforderungen an das verwendete Plasmid gestellt. Einfache Plasmide wie die der pUC-Reihe können verwendet werden. Sollen vollständige Pflanzen aus den transformierten Zellen regeneriert werden, so ist er erforder-

lich, das sich auf dem Plasmid ein zusätzliches selektionierbares Markergen befindet.

Transformationstechniken sind für verschiedene monokotyle und  
5 dikotyle pflanzliche Organismen beschrieben. Ferner stehen  
verschiedene mögliche Plasmidvektoren für die Einführung  
fremder Gene in Pflanzen zur Verfügung, die in der Regel einen  
Replikationsursprung für eine Vermehrung in E.coli und ein  
Markergen für eine Selektion transformierter Bakterien enthalten.  
10 Beispiele sind pBR322, pUC Reihe, M13mp Reihe, pACYC184 etc.

Die Expressionskassette kann in den Vektor über eine geeignete  
Restriktionsschnittstelle eingeführt werden. Das entstandene  
Plasmid wird zunächst in E.coli eingeführt. Korrekt trans-  
15 formierte E.coli werden selektioniert, gezüchtet und das  
rekombinante Plasmid mit dem Fachmann geläufigen Methoden  
gewonnen. Restriktionsanalyse und Sequenzierung können dazu  
dienen, den Klonierungsschritt zu überprüfen.

20 Transformierte Zellen d.h. solche, die die eingeführte DNA  
integriert in die DNA der Wirtszelle enthalten, können von un-  
transformierten selektioniert werden, wenn ein selektionierbarer  
Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist. Als Marker kann  
beispielhaft jedes Gen fungieren, dass eine Resistenz gegen  
25 Antibiotika oder Herbizide zu verleihen vermag. Transformierte  
Zellen, die ein solches Markergen exprimieren, sind in der Lage,  
in der Gegenwart von Konzentrationen eines entsprechenden Anti-  
biotikums oder Herbizides zu überleben, die einen untransformier-  
ten Wildtyp abtöten. Beispiel sind das bar Gen, dass Resistenz  
30 gegen das Herbizid Phosphinothricin verleiht (Rathore KS et  
al., Plant Mol Biol. 1993 Mar;21(5):871-884), das nptII Gen, dass  
Resistenz gegen Kanamycin verleiht, das hpt Gen, das Resistenz  
gegen Hygromycin verleiht, oder das EPSP-Gen, das Resistenz gegen  
das Herbizid Glyphosat verleiht.

35 Je nach Methode der DNA-Einführung können weitere Gene auf dem  
Vektorplasmid erforderlich sein. Werden Agrobacteria verwendet,  
so ist die Expressionskassette in spezielle Plasmide zu inte-  
grieren, entweder in einen Zwischenvektor (englisch: shuttle or  
40 intermediate vector) oder einen binären Vektor. Wenn zum Beispiel  
ein Ti oder Ri Plasmid zur Transformation verwendet werden soll,  
ist zumindest die rechte Begrenzung, meistens jedoch die rechte  
und die linke Begrenzung der Ti oder Ri Plasmid T-DNA als  
flankierende Region mit der einzuführenden Expressionskassette  
45 verbunden. Bevorzugt werden binäre Vektoren verwendet. Binäre  
Vektoren können sowohl in E.coli als auch in Agrobacterium repli-  
zieren. Sie enthalten in der Regel ein Selektionsmarkergen und

## 45

einen Linker oder Polylinker flankiert von der rechten und linken T-DNA Begrenzungssequenz. Sie können direkt in Agrobacterium transformiert werden (Holsters et al., Mol. Gen. Genet. 163 (1978), 181-187). Das Selektionsmarkergen erlaubt eine Selektion transformierter Agrobacteria und ist zum Beispiel das nptII Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin verleiht. Das in diesem Fall als Wirtsorganismus fungierende Agrobacterium sollte bereits ein Plasmid mit der vir-Region enthalten. Diese ist für die Übertragung der T-DNA auf die pflanzliche Zelle erforderlich. 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 120516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam, Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant. Sci., 4:1-46 and An et al., EMBO J. 4 (1985), 277-287). Verschiedene binäre Vektoren sind bekannt und teilweise kommerziell erhältlich wie zum Beispiel pBIN19 (Clontech Laboratories, Inc. U.S.A.).

20

Für den Transfer der DNA in die pflanzliche Zelle werden pflanzliche Explantate mit Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes kokultiviert. Ausgehend von infiziertem Pflanzenmaterial (z.B. Blatt-, Wurzel- oder Stengelteile, aber auch Protoplasten oder Suspensionen von Pflanzenzellen) können ganze Pflanzen unter Verwendung eines geeigneten Mediums, dass zum Beispiel Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, regeneriert werden. Die erhaltenen Pflanzen können dann auf die Präsenz der eingeführten DNA, hier der erfindungsgemäßen Expressionskassette, durchmustert werden. Sobald die DNA in das Wirtsgenom integriert ist, ist der entsprechende Genotyp in der Regel stabil und die entsprechende Insertion wird auch in den Nachfolgegenerationen wiedergefunden. In der Regel enthält die integrierte Expressionskassette einen Selektionsmarker, der der transformierten Pflanze eine Resistenz gegen ein Biozid (zum Beispiel ein Herbizid), einen Metabolismusinhibitor wie 2-DOG oder ein Antibiotikum wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinothricin etc. verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion von transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84). Die erhaltenen Pflanzen können in üblicher Weise gezüchtet und gekreuzt werden. Zwei oder mehr Generationen sollten kultiviert werden, um sicherzustellen, dass die genomische Integration stabil und vererblich ist.

45

## 46

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

10

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

Die Wirksamkeit der Expression der transgen exprimierten Nuklein-  
20 säuren kann beispielsweise *in vitro* durch Sprossmeristem-  
vermehrung unter Verwendung einer der oben beschriebenen  
Selektionsmethoden ermittelt werden.

Erfindungsgemäß sind ferner von den oben beschriebenen transgenen  
25 Organismen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile - wie zum Bei-  
spiel bei transgenen pflanzlichen Organismen Wurzeln, Blätter  
etc.-, und transgenes Vermehrungsgut wie Saaten oder Früchte.

Von Menschen und Tieren verzehrbare erfindungsgemäße, genetisch  
30 veränderte Pflanzen können auch beispielsweise direkt oder nach  
an sich bekannter Aufbereitung als Nahrungsmittel oder Futter-  
mittel verwendet werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der  
35 oben beschriebenen erfindungsgemäßen, transgenen Organismen und  
der von ihnen abgeleitete 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  
40 oder Feinchemikalien.

Bevorzugt ist ferner ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung  
von Pharmazeutika oder Feinchemikalien in Wirtsorganismen wobei  
ein Wirtsorganismus mit einer der oben beschriebenen Expressions-  
45 kassetten oder Vektoren transformiert wird und diese Expressions-  
kassette ein oder mehrere Strukturgene enthält, die für die  
gewünschte Feinchemikalie kodieren oder die Biosynthese der

## 47

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 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 mittels der dem Fachmann bekannten Verfahren. Die Produktion von Pharmazeutika, wie zum Beispiel Antikörpern oder Vakzzinen ist beschrieben bei Hood EE Jilka JM (1999) Curr Opin Biotechnol 10(4):382-6; Ma JK Vine ND (1999) Curr Top Microbiol Immunol 236:275-92.

15

Sequenzen

1. SEQ ID NO: 1  
Promotor and 5'-untranslatierte Region des Arabidopsis thaliana pFD-Promotors.  
20
2. SEQ ID NO: 2  
Promotor and 5'-untranslatierte Region des Arabidopsis thaliana FNR-Promotors.  
25
3. SEQ ID NO: 3  
Promotor and 5'-untranslatierte Region des Arabidopsis thaliana TPT-Promotors (2038 bp).  
30
4. SEQ ID NO: 4  
Promotor and 5'-untranslatierte Region des verkürzten Arabidopsis thaliana pFDs-Promotors  
35
5. SEQ ID NO: 5  
Nukleinsäure kodierend für eine Phosphinothricinacetyltransferase.  
40
6. SEQ ID NO: 6  
Aminosäuresequenz kodierend für eine Phosphinothricinacetyltransferase.  
45
7. SEQ ID NO: 7  
Nukleinsäure kodierend für eine Acetolactatsynthase.

**THIS PAGE WAS NOT FURNISHED UPON FILING  
THE INTERNATIONAL APPLICATION**

**THIS PAGE WAS NOT FURNISHED UPON FILING  
THE INTERNATIONAL APPLICATION**

D: Tabak Internodien

Abbildung 1c:

E: Tabak Blüte; Blaufärbung vor allem in Kelch- und Blütenblättern

5

2. Abbildung 2a-b: Der TPT und der FNR Promotor zeigen ein unterschiedliches Expressionsmuster im vegetativen und germinativen Speichergewebe von Tabak und Kartoffel. Während der TPT Promotor hier aktiv ist, zeigt der FNR Promotor keine Expression. Gezeigt sind GUS histochemische Färbungen von Tabaksamen und Tabaksämlingen sowie von Kartoffelknollen. Beide Promotoren zeigen jedoch wieder eine vergleichbare Aktivität in Sämlingen. Die Intensität der GUS-Blaufärbung entspricht den wiedergegebenen Graustufen. Gezeigt sind:

10

15

Abbildung 2a:

A: Tabaksamen. Beim TPT Promotor sind einzelne blau gefärbte Samenkörner erkennbar (siehe Pfeil). Beim FNR Promotor sind keine Färbungen zu detektieren.

20

B: Kartoffelknollen. Beim TPT Promotor ist eine homogene, starke Blaufärbung der Kartoffelknolle erkennbar. Beim FNR Promotor ist keine oder nur eine sehr schwache Färbung zu detektieren.

25

Abbildung 2b:

C: Tabaksämlinge (10 Tage alt). Beide Promotoren zeigen eine vergleichbare Blaufärbung (siehe Pfeil).

3. Expressionskassetten für die Expression von Kanamycin-(nptII) und Phosphinothricin- (pat) Resistenzmarkern. Kassette A gewährt eine Expression von Kanamycinresistenz unter dem TPT bzw. FNR Promotor, neben einer Phosphinothricinresistenz unter dem NOS Promotor. Kassette B gewährt eine Expression von Phosphinothricinresistenz unter dem TPT bzw. FNR Promotor, neben einer Kanamycinresistenz unter dem NOS Promotor.

35

- LB, RB: Linke bzw. rechte Begrenzung der Agrobacterium T-DNA
- 40 nosP: NOS Promotor
- pat: Nukleinsäuresequenz kodierend für Phosphinothricin-acetyltransferase (pat)
- nptII: Kanamycinresistenzgen (Neomycinphosphotransferase)
- nosT: NOS Terminator
- 45 FNR-P: FNR Promotor
- TPT-P: TPT Promotor

## 51

4. Regeneration transformierter Tabaksprossknospen unter einem Kanamycinselektionsdruck (100 mg/l Kanamycin). A: Transformation mit einem FNR-Promotor - nptII Konstrukt. B: Transformation mit einem TPT-Promotor - nptII Konstrukt. Eine vergleichbar effiziente Regeneration von transformierten Tabakpflanzen konnte beobachtet werden.
5. Keimung transformierter Tabakpflänzchen aus transgener Tabaksaat unter einem Phosphinothricinselektionsdruck (10 mg/l Phosphinotricin).
- A: Transformiert mit einem FNR-Promotor - pat Konstrukt.  
B: Transformiert mit einem TPT-Promotor - pat Konstrukt.  
C: Kontrolle mit nicht-transformierter Tabaksaat.
- Eine vergleichbar effiziente Keimung von mit dem FNR-Promotor-pat Konstrukt und TPT-Promotor-pat Konstrukt transformierten Tabakpflanzen konnte beobachtet werden, während entsprechend behandelte nicht-transformierte Tabakpflanzen keine Resistenz aufwiesen.

## Beispiele

## Allgemeine Methoden:

- Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarosegelelektrophoresen, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von E. coli Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA werden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeführt. Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgt 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 1: Isolierung von genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana* (CTAB-Methode)

- Zur Isolierung genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana* werden ca. 0,25 g Blattmaterial junger Pflanzen im vegetativen Stadium in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörsert. Das pulveri-

## 52

sierte Pflanzenmaterial wird zusammen mit 1 ml 65°C-warmem CTAB I-Puffer (CTAB: Hexadecyltrimethylammoniumbromid, auch genannt Cetyltrimethylammoniumbromid; Sigma Kat.-Nr.: H6269) und 20 µl β-Mercaptoethanol in einen vorgewärmten zweiten Mörser gegeben

5 und nach vollständiger Homogenisierung wird der Extrakt in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und für 1 h bei 65°C unter regelmäßiger, vorsichtiger Durchmischung inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird der Ansatz mit 1 ml Chloroform/Octanol (24:1, mit 1M Tris/HCl, pH8,0 ausgeschüttelt) durch langsames Invertieren

10 extrahiert und zur Phasentrennung für 5 min bei 8.500 rpm (7.500 x g) und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wird die wässrige Phase erneut mit 1 ml Chloroform/Octanol extrahiert, zentrifugiert und durch Invertieren mit 1/10 Volumen auf 65°C vorgewärmtem CTAB II-Puffer sorgfältig gemischt. Anschließend wird

15 der Ansatz durch vorsichtiges Schwenken mit 1 ml Chloroform/Octanol-Gemisch (siehe oben) versetzt und zur erneuten Phasentrennung für 5 min bei 8.500 rpm (7.500 x g) und Raumtemperatur zentrifugiert. Die wässrige untere Phase wird in ein frisches Eppendorff-Gefäß überführt und die obere organische Phase wird in einem frischen

20 Eppendorff-Gefäß erneut für 15 min bei 8.500 rpm (7.500 x g) und Raumtemperatur zentrifugiert. Die hieraus resultierende wässrige Phase wird mit der wässrigen Phase des vorherigen Zentrifugationsschrittes vereinigt und der gesamte Ansatz mit exakt demselben Volumen vorgewärmtem CTAB III-Puffer versetzt. Es

25 folgt eine Inkubation bei 65°C, bis die DNA in Flocken ausfällt. Dies kann bis zu 1 h dauern oder durch Inkubation bei 37°C über Nacht erfolgen. Das aus dem anschließenden Zentrifugationsschritt (5 min, 2000 rpm (500 x g), 4°C) resultierende Sediment wird mit 250 µl auf 65°C vorgewärmtem CTAB IV-Puffer versetzt und

30 für mindestens 30 min bzw. bis zur vollständigen Auflösung des Sediments bei 65°C inkubiert. Anschließend wird die Lösung zur Fällung der DNA mit 2,5 Volumina eiskaltem Ethanol vermischt und für 1h bei -20°C inkubiert. Alternativ kann der Ansatz mit 0.6 Volumina Isopropanol vermischt und ohne weitere Inkubation

35 sofort für 15 min bei 8.500 rpm (7.500 x g) und 4°C zentrifugiert werden. Die sedimentierte DNA wird durch Invertieren des Eppendorff-Gefäßes zweimal mit je 1 ml 80%igem eiskaltem Ethanol gewaschen, nach jedem Waschschrift erneut zentrifugiert (5 min, 8.500 rpm (7.500 x g), 4°C) und anschließend für ca. 15 min luft-

40 getrocknet. Abschließend wird die DNA in 100 µl TE mit 100 µg/ml RNase resuspendiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA Lösung ist nach einer weiteren Inkubationsphase über Nacht bei 4°C homogen und kann für weiterführende Experimente verwendet werden.

## 53

Lösungen für CTAB:

Lösung I (für 200 ml):

- 100 mM Tris/HCl pH 8,0 (2,42 g)
- 5 1,4 M NaCl (16,36 g)
- 20 mM EDTA (8,0 ml von 0,5 M Stammlösung)
- 2 % (w/v) CTAB (4,0 g)

Jeweils vor der Verwendung werden frisch zugesetzt: 2%

- 10  $\beta$ -Mercaptoethanol (20  $\mu$ l für 1 ml Lösung I).

Lösung II (für 200 ml):

- 0,7 M NaCl (8,18 g)
- 10 % (w/v) CTAB (20 g)

15

Lösung III (für 200 ml):

- 50 mM Tris/HCl pH 8,0 (1,21 g)
- 10 mM EDTA (4 ml 0,5 M von 0,5 M Stammlösung)
- 1 % (w/v) CTAB (2,0 g)

20

Lösung IV (High-salt TE) (für 200 ml):

- 10 mM Tris/ HCl pH 8,0 (0,242 g)
- 0,1 mM EDTA (40  $\mu$ l 0.5 M Stammlösung)
- 1 M NaCl (11, 69 g)

25

Chloroform/Octanol (24:1) (für 200 ml):

- 192 ml Chloroform
- 8 ml Octanol
- Die Mischung wird 2x mit 1 M TrisHCl pH 8,0 ausgeschüttelt
- 30 und vor Licht geschützt gelagert.

Beispiel 2: Transformation von Tabak, Raps und Kartoffel

- 35 Die Transformation von Tabak erfolgte über Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens*. gemäß der von Horsch entwickelten Methode (Horsch et al. (1985) Science 227: 1229-1231). Alle zur Transformation verwendeten Konstrukte wurden anhand der Gefrier/Tau-Methode (wiederholtes Auftauen und Einfrieren) in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert. Die das gewünschte Konstrukt ent-
- 40 haltenden *Agrobacterium*-Kolonien wurden auf Mannitol/Glutamat-Medium mit 50  $\mu$ g/ml Kanamycin, 50  $\mu$ g/ml Ampicilin und 25  $\mu$ g/ml Rifampicin selektioniert.

- 45 Zur Transformation von Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN) wurden 10 ml einer unter Selektion gewachsenen Übernachtskultur von *Agrobacterium tumefaciens* abzentrifugiert, der Überstand verworfen, und die Bakterien im gleichen Volumen Anti-

## 54

biotika-freien Mediums resuspendiert. In einer sterilen Petrischale wurden Blattscheiben steriler Pflanzen (Durchmesser ca. 1cm) in dieser Bakterienlösung gebadet. Anschließend wurden die Blattscheiben in Petrischalen auf MS-Medium (Murashige und Skoog 5 (1962) *Physiol Plant* 15:473ff.) mit 2% Saccharose und 0.8% Bacto-Agar ausgelegt. Nach 2-tägiger Inkubation im Dunkeln bei 25°C wurden sie auf MS-Medium mit 100 mg/l Kanamycin, 500 mg/l Claforan, 1mg/l Benzylaminopurin (BAP), 0,2 mg/l Naphtylessigsäure (NAA), 1,6% Glukose und 0.8% Bacto-Agar übertragen und 10 die Kultivierung (16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkelheit) fortgesetzt. Wachsende Sprosse wurden auf hormonfreies MS-Medium mit 2% Saccharose, 250 mg/l Claforan und 0,8% Bacto-Agar überführt.

Die Transformation von Raps erfolgte mittels der Petiolentrans- 15 formation nach Moloney et al. (Moloney MM, Walker JM & Sharma KK (1989) *Plant Cell Reports* 8:238-242).

Zur Transformation von Kartoffel (*Solanum tuberosum*) wurden Blattscheiben und Internodien von in vitro Pflanzen mit *Agrobacterium tumefaciens* in flüssigem Murashige Skoog Medium für 20 Minuten infiziert, und anschließend für 2 d im Dunkeln co-kultiviert. Nach der Co-cultur wurden die Explantate auf festes MS Medium, das anstelle von Saccharose 1,6% Glucose enthält (MG) und mit 5 mg/l NAA, 0,1 mg/l BAP, 250 mg/l Timentin und 30 bis 40 mg/l Kanamycin ergänzt worden ist (KIM), bei 21°C in einem Licht/Dunkel- 25 Rhythmus von 16h/8h kultiviert. Nach diese Kallusphase wurden die Explantate auf Sproßinduktionsmedium (SIM) gelegt. SIM war wie folgt zusammengesetzt: MG + 2 mg/l Zeatinribosid, 0,02 mg/l NAA, 0,02 mg/l GA3, 250 mg/l Timentin, 30 bis 40 mg/l Kanamycin. Alle 30 zwei Wochen wurden die Explantate auf frisches SIM transferiert. Die sich bildenden Sprosse wurden auf MS Medium mit 2% Saccharose und 250 mg/l Timentin und 30 bis 40 mg/l Kanamycin bewurzelt.

35 Beispiel 3: Untersuchungen zur Eignung des putativen Ferredoxin (pFD) Promotors

a) Klonierung des pFD Promotors aus *Arabidopsis thaliana*

40 Der putative Ferredoxin-Promotor wurde mittels PCR aus genomischer *Arabidopsis thaliana* DNA mit den Primern pWL35 und pWL36 amplifiziert. Der Primer pWL35 beginnt mit den in Fettdruck hervorgehobenen *SalI* und *EcoRI* Restriktionsschnittstellen unmittelbar vor der kodierenden Region des pFD-Gens. Der Primer 45 pWL36 beginnt mit den in Fettdruck hervorgehobenen *SalI* und *Asp718* Restriktionsschnittstellen.

## 55

Primer pWL35 (SEQ ID NO: 9)

5' **GTC GAC GAA TTC** GAG AGA CAG AGA GAC GG 3'

Primer pWL36 (SEQ ID NO: 10)

5' **GTC GAC GGT ACC** GAT TCA AGC TTC ACT GC 3'

Reaktionsansatz:

- 1 µl            Genomische *Arabidopsis* DNA (ca. 250 ng)  
0,5 µl        Tth-Polymerase (2U/µl)  
10    3 µl        Mg(OAc)<sub>2</sub> (25mM, final conc. 1,5 mM Mg<sup>2+</sup>)  
15,2 µl      3,3 x Puffer  
4 µl        dNTPs (jeweils 2,5 mM, Takara, Endkonzentration:  
              jeweils 200 µM)  
24,3 µl      H<sub>2</sub>O

15

PCR-Bedingungen:

- 1    Zyklus mit 3 min. bei 95°C  
20    10    Zyklen mit 94°C für 10 sec, 50°C für 20 sec und 72°C für  
          1 min.  
20    20    Zyklen mit 94°C für 10 sec, 65°C für 20 sec und 72°C für  
          1 min.  
25    1    Zyklus mit 72°C für 5 min.,  
          anschließend Kühlung auf 4°C bis zur Weiterverarbeitung.

b) Konstruktion der pFD-Promotor-GUS-Expressionskassette

- Das pFD-Promotor PCR-Produkt wurde in den Vektor pCRII (Invitro-  
30 gen) kloniert und anschließend mittels der durch das Primerpaar  
eingeführten *Sal*I-Restriktionsschnittstellen isoliert und gel-  
elektrophoretisch gereinigt. Für die Fusion mit dem GUS Gen wurde  
das ca. 850 bp umfassende pFD-Promotorfragment in den *Sal*I-ge-  
schnittenen Binärvektor pBI101.2 (Clontech Inc.) kloniert und die  
35 Orientierung des Fragments wurde anschließend anhand von Restrik-  
tionsanalysen unter Verwendung der Endonukleasen *Bgl*II und *Bam*HI  
verifiziert. Das resultierende Plasmid pFD::GUS wurde in Tabak  
transformiert. Die erzeugten Tabakpflanzen wurden pFD:GUS ge-  
nannt.

40

c) Konstruktion der pFD-Promotor-nptII-Expressionskassette

- Der putative Ferredoxin-Promotor wurde mittels PCR aus  
genomischer *Arabidopsis thaliana* DNA amplifiziert. Dabei wurden  
45 über die Primer die Restriktionsstellen *Eco*RI und *Nco*I angefügt.

## 56

Primer pFD1 (SEQ ID NO: 11)

5' GAG AAT TCG ATT CAA GCT TCA CTG C

Primer pFD2 (SEQ ID NO: 12)

5' CCA TGG GAG AGA CAG AGA GAC G

Reaktionsansatz:

|    |         |                                                                |
|----|---------|----------------------------------------------------------------|
|    | 37,5 µl | H <sub>2</sub> O                                               |
| 10 | 5,0 µl  | 10X Reaktionspuffer (Endkonzentration Mg <sup>2+</sup> 1,5 mM) |
|    | 4,0 µl  | dNTP mix (jeweils 2,5 mM)                                      |
|    | 1,0 µl  | Primer pFD1 (10 µM)                                            |
|    | 1,0 µl  | Primer pFD2 (10 µM)                                            |
|    | 0,5 µl  | Taq-Polymerase (Takara, 2U/µl)                                 |
| 15 | 1,0 µl  | genomischer Arabidopsis DNA (ca. 250 ng)                       |

PCR-Bedingungen:

- 1 Zyklus mit 3 min. bei 94°C
- 20 10 Zyklen mit 94°C für 10 sec, 48°C für 20 sec und 72°C für 1 min
- 25 Zyklen mit 94°C für 10 sec, 65°C für 20 sec und 72°C für 1 min
- 1 Zyklus mit 72°C für 5 min.

25

Das PCR Produkt wurde in das Plasmid pCRII (Invitrogen) subkloniert. Das Plasmid pCAMBIA 2300 (CAMBIA, GPO Box 3200, Canberra ACT 2601, Australia; GenBank Acc.-No: AF234315; Binary vector pCAMBIA-2300, complete sequence; Hajdukiewicz P et al.

- 30 (1994) Plant Mol Biol 25(6):989-994) wurde mit EcoRI/NcoI geschnitten und das pFD Promotorfragment als EcoRI/NcoI Fragment aus dem pCRII Plasmid in diesen Vektor umkloniert. Dabei wurde der 35S Promotor aus dem Cambiavektor entfernt. Das resultierende Plasmid wurde als pFD-Promotor:NPTII bezeichnet und in Tabak
- 35 transformiert.

d) Ergebnisse der GUS Analyse der transgenen Tabakpflanzen

Im Rahmen histochemischer Untersuchungen zeigten transgene pFD ::

- 40 GUS Tabakpflanzen eine starke GUS-Färbung in 'source'-Blättern und eine schwache GUS-Färbung in den Geweben aller Blütenorgane. Eine starke Färbung im Wurzelgewebe wurde nur bei *in vitro*-Pflanzen beobachtet, deren Wurzeln der Belichtung ausgesetzt waren. Anhand von Blattscheiben, die aus als pFD::GUS-positiv
- 45 identifizierten Pflanzen ausgestanzt worden waren, wurde Kalluswachstum induziert. Das Kallusgewebe sowie die sich daraus entwickelnden Pflanzensprosse zeigten eine GUS-Färbung, die in ihrer

Intensität der GUS-Färbung von CaMV35S::GUS (in pCambia 1304; CAMBIA, GPO Box 3200, Canberra ACT 2601, Australia; GenBank Acc.-No.: AF234300, Binary vector pCAMBIA-1304, complete sequence, Hajdukiewicz P et al. (1994) Plant Mol. Biol. 25(6):989-994)

- 5 (1994)) transgenen Pflanzen vergleichbar war. In der unten aufgeführten Tabelle (Tab. 3) wurden die Daten zur Quantifizierung der GUS-Aktivität in den Antheren (Staubbeuteln) und 'source'-Blättern ausgewählter transgener pFD::GUS Tabakpflanzen zusammengestellt.

10

Tabelle 3: Quantifizierung der GUS-Aktivität in den Antheren und 'source'-Blättern ausgewählter transgener pFD::GUS Tabakpflanzen

| 15 | pFD :: GUS<br>Pflanze No. | GUS-Aktivität (pmol [4MU]/mg[protein]/min) |                  |
|----|---------------------------|--------------------------------------------|------------------|
|    |                           | Antheren                                   | 'Source' Blätter |
|    | pFD5                      | 275                                        | 3785             |
|    | pFD11                     | 174                                        | 6202             |
|    | pFD14                     | 362                                        | 2898             |
| 20 | pFD15                     | 57                                         | 2678             |

Die Antheren der reifen Blüten zeigen keine Promotoraktivität. Bei geschlossenen Blüten ist sie schwach ausgeprägt.

- 25 e) Ergebnisse der Analyse der Kanamycinresistenz der transgenen Tabakpflanzen

- Für die Untersuchung der pFD-Promotor gestützten Vermittlung von Resistenz gegen Kanamycin wurde das pFD-Promotor:NPTII Plasmid
- 30 in Tabak transformiert. Die selektive Regeneration der Tabakpflänzchen erfolgte auf Kanamycin (100 mg/l). Die aus den sich entwickelnden Sprossknospen regenerierten Pflanzen enthielten das Kanamycin, was zeigte, dass der pFD Promotor das NPTII Genexprimiert hat und somit die Selektion ermöglichte. Die Ergebnisse
- 35 demonstrieren, dass die isolierte Nukleinsäuresequenz die gewünschten vorteilhaften Promotoreigenschaften besitzt, d.h. sie zeigt eine Promotoraktivität, die geeignet ist Selektionsmarker effektiv zu exprimieren und weist eine nur geringe Aktivität im Pollen auf. Die Aktivität in den Antheren beträgt in der Regel
- 40 weniger als 10% der Aktivität in den Source-Blättern.

- f) Ergebnisse der GUS Analyse der transgenen Kartoffelpflanzen

- Das Plasmid pFD::GUS (vgl. Beispiel 3 b) wird entsprechend der in
- 45 Beispiel 2 beschriebenen Methode in Kartoffeln transformiert.

## 58

Ergebnis der funktionellen Untersuchungen: Der pFD-Promotor wird stark in den Blättern der analysierten transgenen Kartoffelpflanzen exprimiert. Eine stärkere GUS Färbung in den Blättern der Kartoffelpflanzen als in den Blättern der beschriebenen Tabakpflanzen wurde beobachtet. Schwache Färbung der Blüten bzw. fehlende Färbung der Knollen zeigte geringe Expression in den Blüten und keine Expression in den Knollen.

Die Daten zeigen, dass dieser Promoter keine Aktivität in den Knollen von Kartoffelpflanzen hat und geeignet ist für die Expression von Genen, beispielsweise von Insektiziden, in den Blättern und anderen oberirdischen Organen von Pflanzen, deren Genprodukte in den Speicherorganen unerwünscht sind.

#### 15 g) Herstellung von Deletionsvarianten des pFD Promotors

Eine weitere Variante des pFD Promotors stellt die Deletion pFD-short (pFDs) dar. Dazu wurde der Abschnitt von Basenpaar 137 bis 837 des pFD Promotors unter Verwendung nachfolgender Primer amplifiziert:

pFD3 (SEQ ID NO: 13):

5'-acggatccgagagacagagagacggagacaaaa-3'

25 pFD5 (SEQ ID NO: 14):

5'gcggatccaacactcttaacaccaaataca-3'

Reaktionsansatz:

|    |         |                                                      |
|----|---------|------------------------------------------------------|
| 30 | 37,5 µl | H <sub>2</sub> O                                     |
|    | 5,0 µl  | 10X Reaktionspuffer ("genomic PCR")                  |
|    | 4,0 µl  | dNTP mix (jeweils 2,5 mM)                            |
|    | 2,2 µl  | 25 mM Mg(OAc) <sub>2</sub> (Endkonzentration 1,1 mM) |
|    | 1,0 µl  | Primer pFD3 (10 µM)                                  |
| 35 | 1,0 µl  | Primer pFD5 (10 µM)                                  |
|    | 0,5 µl  | Pfu-turbo Polymerase Mix                             |
|    | 1,0 µl  | Genomische Arabidopsis DNA (ca. 250 ng)              |

PCR-Bedingungen:

|    |                                                                    |
|----|--------------------------------------------------------------------|
| 40 | 1 Zyklus mit 5 min. bei 95°C                                       |
|    | 25 Zyklen mit 94°C für 30 sec, 50°C für 60 sec und 72°C für 1 min. |
|    | 1 Zyklus mit 50°C für 60 sec, 72°C für 10 min.,                    |
| 45 | anschließend Kühlung auf 4°C bis zur Weiterverarbeitung            |

Die Primer enthielten Erkennungssequenzen für das Restriktionsenzym BamHI. Nach Spaltung des PCR Produktes mit BamHI wurde es in das Plasmid pGUSINT37 (s.o.), das ebenfalls BamHI geschnitten und dephosphoryliert wurde, ligiert. Mit dem resultierenden

5 Konstrukt pFDsGUSINT wurden Tabakblätter mit der Biolistics (BioRad) beschossen. Dabei wurden Microcarrier (25 µg Gold, Heraeus 0,3 bis 3 µm) mit 10 µg Plasmid DNA, 2,5 M CaCl<sub>2</sub>, und 0,1 M Spermidine behandelt, mit Alkohol gewaschen und bei einem Vakuum von 26 inch und einem Druck von 1100 psi auf die Blätter,

10 die auf MS-Medium lagen, geschossen. Die Explantate wurden anschließend für 24 h in MS-Medium mit 2% Sucrose inkubiert und dann mit X-gluc histochemisch gefärbt. Blaue Spots zeigten die Aktivität des Promotors.

15 h) Fusion des pFDs Promotors mit dem NPTII Gen

Als BamHI Fragment wird der pFDs Promotor aus pFDsGUSINT herausgeschnitten und seine Enden mittels Klenow-"Fill-In" geglättet. das erhaltene Fragment wird vor das NPTII Gen des Plasmids

20 pSUN5NPTIICat (SEQ ID NO: 24), EcoRV geschnitten und dephosphoryliert, kloniert. Das Plasmid pSUN5NPTII ist ein Derivat des Plasmids pSUN3 (SEQ ID NO: 23), welches neben einer nosP/Pat Kasette noch ein promotorloses NPTII Gen enthält. Mit diesem

25 Konstrukt ist es möglich Promotoren auf ihre Fähigkeit zur Expression von NPTII zu testen. Parallel kann die Selektion auf Phosphinothricin enthaltenden Medium erfolgen.

Das resultierende Plasmid pSun5FdsNPTII wird in Tabak transformiert. Regenerierte und selektierte Sprosse zeigten, dass

30 der pFDs Promotor die Selektion auf NPTII erlaubt.

Beispiel 4: Untersuchungen zur Eignung des Ferredoxin NADPH Oxidoreduktase (FNR) Promotors

35 a) Klonierung des FNR Promotors aus *Arabidopsis thaliana*

Die putative Promotorregion des FNR-Gens wurde unter Verwendung der Oligonukleotid-primer L-FNRara und R-FNRara aus genomischer DNA amplifiziert wobei das ATG-Startcodon des FNR-Gens ausgespart

40 und vier putative Stop-Codons des stromaufwärts gelegenen offenen Leserahmens beibehalten wurden. Anhand der Primer L-FNRara und R-FNRara wurde der FNR-Promotor als ein 635 bp großes Fragment entsprechend dem Abschnitt des Klons K2A18.15 von Position 69493 bis Position 70127 (beide Nukleotide inklusive) mittels PCR aus

45 genomischer *Arabidopsis thaliana* DNA amplifiziert. Der Primer L-FNRara beginnt mit den in Fettdruck hervorgehobenen SalI und BamHI Restriktionsschnittstellen und befindet sich stromaufwärts

## 60

vor den vier Stop-Codons des dem FNR-Promotor vorgeschalteten Gens. Der Primer R-FNRara beginnt mit den in Fettdruck hervorgehobenen *SalI* und *XbaI* Restriktionsschnittstellen unmittelbar vor dem ATG-Startcodon des FNR-Gens.

5

Primer L-FNR ara (44 mer) (SEQ ID NO: 15):

5' **GTC GAC GGA TCC** GGT TGA TCA GAA GAA GAA GAA GAA GAT GAA CT 3'

Primer R-FNR ara (41 mer) (SEQ ID NO: 16):

10 5' **GTC GAC TCT AGA** TTC ATT ATT TCG ATT TTG ATT TCG TGA CC 3'

Zur Amplifizierung des FNR-Promotors wurde ein sogenanntes 'touchdown' PCR-Protokoll unter Verwendung des 'Advantage Genomic Polymerase Mix' (Clontech Laboratories, Inc; Katalog-Nr. #8418-1)

15 benutzt. Der obengenannte Polymerase-Mix enthält eine thermostabile DNA-Polymerase aus *Thermus thermophilus* (*Tth* DNA Polymerase), gemischt mit einem kleineren Anteil der "Vent Proof-reading 3'-5' Polymerase", und den *Tth* Start Antikörper, der "hot-start" PCR ermöglicht.

20

Reaktionsansatz:

|    |         |                                                      |
|----|---------|------------------------------------------------------|
|    | 36,8 µl | H <sub>2</sub> O                                     |
|    | 5 µl    | 10X Reaktionspuffer ("genomic PCR")                  |
| 25 | 1 µl    | dNTP mix (jeweils 10 mM)                             |
|    | 2,2 µl  | 25 mM Mg(OAc) <sub>2</sub> (Endkonzentration 1,1 mM) |
|    | 1 µl    | Primer L-FNR ara (10 µM)                             |
|    | 1 µl    | Primer R-FNR ara (10 µM)                             |
|    | 1 µl    | 50x Polymerase Mix                                   |
| 30 | 2 µl    | Genomische <i>Arabidopsis</i> DNA (ca. 500 ng)       |

PCR-Bedingungen:

|    |    |                                                          |
|----|----|----------------------------------------------------------|
|    | 1  | Zyklus mit 1 min. bei 94°C                               |
| 35 | 10 | Zyklen mit 94°C für 30 sec und 70°C für 3 min.           |
|    | 32 | Zyklen mit 94°C für 30 sec und 65°C für 3 min.           |
|    | 1  | Zyklus mit 65°C für 4 min.,                              |
|    |    | anschließend Kühlung auf 4°C bis zur Weiterverarbeitung. |

40

b) Konstruktion der FNR-Promotor-GUS-Expressionskassette

Das FNR-Promotor PCR-Produkt wurde nach Gel-elektrophoretischer Auftrennung und Reinigung aus dem Gel mit dem Quiagen-PCR-Reini-

45 gungskit per TA-Klonierung in den Vektor pCRII (Invitrogen) kloniert. Das Promotorfragment wurde anschließend aus dem resultierenden Plasmid pATFNR1 mittels der durch das Primerpaar

## 61

eingeführten *Xba*I und *Bam*HI-Restriktionsschnittstellen durch Verdau mit *Xba*I/*Bam*HI isoliert und gelelektrophoretisch gereinigt. Für die Fusion mit dem GUS Gen wurde das ca. 600bp umfassende FNR-Promotorfragment in den *Xba*I/*Bam*HI-restringierten Binärvektor

5 pBI101 kloniert. Die korrekte Insertion des richtigen Fragments im resultierenden Plasmid pATFNR-Bi wurde anschließend anhand einer Restriktionsanalyse unter Verwendung der Endonukleasen *Eco*RV verifiziert. Das Plasmid pATFNR-Bi wurde zur Tabaktransformation verwendet.

10

Für die Transformation in Raps wurde der FNR Promoter als *Sal*I Fragment des Plasmids pCR\_ATFNR in den mit *Sal*I und *Xho*I geschnittenen Vektor pS3NitGUS, den Nitrilase Promotor ersetzend, kloniert.

15

c) Konstruktion der FNR-Promotor-PAT-Expressionskassette

Für die Untersuchung der FNR-Promotor gestützten Vermittlung von Resistenz gegen Phosphinothricin wurde der FNR-Promotor als

20 *Sal*I Fragment aus dem Plasmid pATFNR1 vor das Phosphinothricin Resistenzgen in das *Sal*I geschnittene Plasmid pSUN3PatNos (SEQ ID NO: 25) kloniert.

d) Konstruktion der FNR-Promoter-NptII-Expressionskassette

25

Für die Vermittlung von Resistenz gegen Kanamycin wurde der FNR Promotor als *Sal*I Fragment vor das NptII-Resistenzgen in das *Xho*I geschnittene, dephosphorylierte Plasmid pSUN5NptIICat (Sungene GmbH & Co KGaA, SEQ ID NO: 24) kloniert. Das resultierende

30 Plasmid mit der Bezeichnung pS5FNRNptII wurde in Tabak und in Raps transformiert.

e) Ergebnisse der GUS Analyse der transgenen Tabakpflanzen

35

Qualitative Daten:

Transgene FNR::GUS-Tabakpflanzen zeigten starke GUS-Expression in allen grünen Geweben, vor allem in, source'-Blättern, Blatt-

40 stielen und Internodien sowie allen Blütenorganen voll entwickelter Blüten (Ovarium, Stigma, Kelch- und Kronblätter) mit Ausnahme von Pollen, der keine GUS-Aktivität zeigte; eine geringe Färbungsintensität wurde in Antheren detektiert. Bei der ersten Analyse von Blattscheibchen von 80 *in vitro*-Pflanzen zeigten

45 70 Pflanzen eine starke GUS-Färbung mit geringer Variation in der Färbeintensität zwischen den individuellen Pflanzen. Das wurde als Hinweis darauf gewertet, dass der FNR-Promotor ein Element

## 62

enthält, dass für limitierte Positionseffekte sorgt. In den Gewebekulturpflanzen war die GUS-Aktivität der FNR::GUS Pflanzen deutlich geringer als die der TPT::GUS Pflanzen. Transgene Rapspflanzen zeigten das gleiche Färbemuster.

5

Samenmaterial (F1) der Linien FNR 13, FNR 45 und FNR 28 wurde bezüglich seiner GUS-Aktivität analysiert. Dabei zeigte sich, dass weder in ruhenden Samen noch in ausgebrachten Keimlingen (3.5 Tage nach Aussaat) GUS-Aktivität detektiert werden konnte.

10

In späteren Keimlingsstadien (6 und 10 Tage nach Aussaat) wurde starke GUS-Aktivität in Keimblättern und im oberen Bereich der Keimlingsachse detektiert, wogegen keine GUS-Färbung in den Wurzeln gefunden wurde. Bei Keimlingen, die im Dunkeln angezogen

15 wurden, war die GUS-Aktivität auf die Kotyledonen beschränkt und war insgesamt geringer als bei lichtgekeimten Sämlingen.

Quantitative Daten:

20 Die quantitative Untersuchung der GUS-Aktivität in FNR::GUS transgenen Tabakpflanzen (transformiert mit Plasmid pATFNR-Bi) wurde an den ersten voll entwickelten Blättern von Tabakpflanzen 21 Tage nach dem Transfer von der Gewebekultur ins Gewächshaus analysiert. Die Daten entsprechen dem Mittelwert von vier

25 unabhängigen Messungen.

Tabelle 4: Quantifizierung der GUS-Aktivität in Blattmaterial ausgewählter transgener FNR::GUS Tabakpflanzen (transformiert mit Plasmid pATFNR-Bi)

30

| 35 | FNR::GUS<br>No. der<br>Pflanze | Rang<br>(x-stärkste<br>GUS-Aktivität<br>unter<br>50 Pflanzen) | GUS Aktivität<br>(pmol 4-MU/mg Protein/min) | Standard-<br>abweichung |
|----|--------------------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------|
|    |                                |                                                               |                                             |                         |
|    | 13                             | 1                                                             | 86491                                       | 2974                    |
|    | 45                             | 2                                                             | 41726                                       | 1829                    |
|    | 14                             | 7                                                             | 23951                                       | 2443                    |
| 40 | 28                             | 9                                                             | 22148                                       | 401                     |
|    | 17                             | 10                                                            | 21557                                       | 1157                    |
|    | 30                             | 20                                                            | 13444                                       | 744                     |
|    | 40                             | 26                                                            | 11972                                       | 1144                    |
|    | 25                             | 35                                                            | 7662                                        | 519                     |
|    | 35                             | 39                                                            | 5643                                        | 96                      |
| 45 | 21                             | 43                                                            | 2858                                        | 194                     |
|    | C2- (WT)                       | 49                                                            | 28                                          | 4                       |

## 63

- f) Ergebnisse der Analyse der Phosphinothricinresistenz der transgenen Tabakpflanzen

Das Plasmid pSUN3FNRPat wurde unter Verwendung des Agrobacterium tumefaciens Stamm EHA101 zur Tabaktransformation, wie unter 3. beschrieben, verwendet. Die selektive Regeneration der Tabakpflänzchen erfolgte einerseits auf Phosphinothricin (5 mg/l) und andererseits zur Kontrolle auf Kanamycin (100 mg/l). 97% der Explantate, die unter Kanamycindruck (nosP:NPTII) und 40% der Explantate, die unter Phosphinothricindruck (FNR:Bar) selektiert wurden, entwickelten Sprossknospen. Die unter Phosphinothricindruck regenerierten Pflanzen enthielten sowohl das Kanamycin als auch das Phosphinothricin, was zeigte, dass der FNR Promotor das Phosphinothricinacetyltransferase Gen exprimiert hat und somit die Selektion ermöglichte. Samen der transgenen Tabakpflanzen wurden auf MS Medium, welches 10 mg/l Phosphinothricin enthielt, ausgelegt und die Keimungsrate bestimmt. Im Gegensatz zur Kontrolle mit nicht transformierten Tabaksamen entwickelten sich die Keimlinge normal. In den Nachkommenschaften der Linien wurde das übertragene und durch den FNR Promotor exprimierte Gen der Phosphinothricinacetyltransferase mittels PCR nachgewiesen. Die Ergebnisse demonstrieren, dass die isolierte Nukleinsäuresequenz die gewünschten vorteilhaften Promotoreigenschaften besitzt, d.h. sie zeigt eine Promotoraktivität, die geeignet ist, Selektionsmarker effektiv zu exprimieren und weist keine Aktivität im Pollen auf.

- g) Ergebnisse der Analyse der Kanamycinresistenz der transgenen Tabak- und Rapspflanzen

30

Für die Untersuchung der FNR-Promotor gestützten Vermittlung von Resistenz gegen Kanamycin wurde der FNR-Promotor mit dem NptII Gen kombiniert. Das resultierende Konstrukt pS5FNRNptII wurde in den Agrobacterium tumefaciens Stamm GV3101[mp90] für die Transformation in Tabak und Raps transformiert.

35

Samen der transgenen Tabakpflanzen wurden auf MS Medium, welches 100 mg/l Kanamycin enthielt, ausgelegt und die Keimungsrate bestimmt. Im Gegensatz zur Kontrolle mit nicht transformierten Tabaksamen entwickelten sich die Keimlinge normal. In den Nachkommenschaften der Linien wurde das übertragene und durch den FNR Promotor exprimierte Gen der Neomycin Phosphotransferase (nptII) mittels PCR nachgewiesen.

45

Die resultierenden Stämme sind für die Transformation, wie unter Beispiel 2 beschrieben, eingesetzt worden. Die selektive Regeneration wurde in Gegenwart von 100 mg/l (bzw. 18 mg/l für

Raps) Kanamycin erreicht. Die unter Kanamycindruck regenerierten Pflanzen enthielten sowohl das Kanamycin als auch das Phosphinothricin, was zeigte, dass der FNR Promotor das NptII Gen exprimiert hat und somit die Selektion der Pflanzen ermöglichte.

5

Die Ergebnisse demonstrieren, dass die isolierte Nukleinsäuresequenz die gewünschten vorteilhaften Promotoreigenschaften besitzt, d.h. sie zeigt eine Promotoraktivität, die geeignet ist, Selektionsmarker effektiv zu exprimieren und weist keine

10

Aktivität im Pollen auf.

h) Ergebnisse der GUS Analyse der transgenen Kartoffelpflanzen

15

Die Analyse von putativ transgenen Kartoffelpflanzen zeigte bei 20 Linien eine starke GUS Färbung in den Blättern, vergleichbar mit dem Expressionspattern der Tabakpflanzen. Mit der Ausnahme von 5 Pflanzen, die eine sehr schwache Färbung in den Kartoffelknollen aufwiesen, konnte keine Expression des FNR Promoters in den verbleibenden Pflanzen nachgewiesen werden.

20

Die Daten zeigen, dass dieser Promoter keine oder sehr schwache Aktivität in den Speicherorganen von Kartoffelpflanzen hat und geeignet ist für die Expression von Genen, beispielsweise von Insektiziden, in den Blättern und anderen oberirdischen Organen von Pflanzen, deren Genprodukte in den Speicherorganen unerwünscht sind.

25

Beispiel 5: Untersuchungen zur Eignung des Triose-Phosphat Translokator (TPT) Promotors

30

a) Klonierung des TPT Promotor aus *Arabidopsis thaliana*

35

Die putative Promotor-Region des TPT-Gens aus *Arabidopsis thaliana* wurde durch Amplifizierung mit den Oligonukleotid-Primern L-TPTara und R-TPTara isoliert, wobei das ATG-Startcodon des TPT-Gens ausgespart wurde. Anhand der Primer L-TPTara und R-TPTara wurde der TPT-Promotor als ein 2038 bp großes Fragment mittels PCR aus genomischer *Arabidopsis thaliana* DNA amplifiziert (SEQ ID NO: 3). Der Primer L-TPTara beginnt mit den in Fettdruck hervorgehobenen *SalI* und *BamHI* Restriktionsschnittstellen. Der Primer R-TPTara beginnt mit den in Fettdruck hervorgehobenen *AatII*, *SalI* und *XbaI* Restriktionsschnittstellen unmittelbar vor dem ATG-Startcodon des TPT-Gens.

40

45

Primer L-TPTara (SEQ ID NO: 17):

## 65

5' AAG TCG ACG GAT CCA TAA CCA AAA GAA CTC TGA TCA TGT ACG TAC  
CCA TT 3'

Primer R-TPTara (SEQ ID NO: 18):

5 5' AGA CGT CGA CTC TAG ATG AAA TCG AAA TTC AGA GTT TTG ATA GTG  
AGA GC 3'

Zur Amplifizierung des TPT-Promotors wurde ein sogenanntes  
,touchdown' PCR-Protokoll unter Verwendung des ,Advantage Genomic  
10 Polymerase Mix' (Clontech Laboratories, Inc; Katalog-Nr. #8418-1)  
benutzt. Der obengenannte Polymerase-Mix enthält eine thermo-  
stabile DNA-Polymerase aus *Thermus thermophilus* (*Tth* DNA poly-  
merase), gemischt mit einem kleineren Anteil der ,Vent proof-  
reading 3'-5' Polymerase', und dem *Tth* Start Antikörper, der  
15 "hot-start" PCR ermöglicht.

Reaktionsansatz:

|    |         |                                                     |
|----|---------|-----------------------------------------------------|
|    | 36,8 µl | H <sub>2</sub> O                                    |
| 20 | 5 µl    | 10X Reaktionspuffer ("genomic PCR")                 |
|    | 1 µl    | dNTP mix (jeweils 10 mM)                            |
|    | 2,2 µl  | 25mM Mg(OAc) <sub>2</sub> (Endkonzentration 1,1 mM) |
|    | 1 µl    | Primer L-FNR ara (10 µM)                            |
|    | 1 µl    | Primer R-FNR ara (10 µM)                            |
| 25 | 1 µl    | 50x Polymerase Mix                                  |
|    | 2 µl    | Genomische <i>Arabidopsis</i> DNA (ca. 500 ng)      |

PCR-Bedingungen:

30 1 Zyklus mit 1 min. bei 94°C  
10 Zyklen mit 94°C für 30 sec und 70°C für 3 min.  
32 Zyklen mit 94°C für 30 sec und 65°C für 3 min.  
1 Zyklus mit 65°C für 4 min., anschließend Kühlung auf 4°C  
bis zur Weiterverarbeitung.

35

b) Konstruktion der TPT-Promotor-GUS-Expressionskassette

Das TPT-Promotor PCR-Produkt wurde nach Gel-elektrophoretischer  
Auftrennung und Reinigung aus dem Gel mit dem Quiagen-PCR-Reini-  
40 gungskit per TA-Klonierung in den Vektor pCRII (Invitrogen)  
kloniert. Das Promotorfragment wurde anschließend aus dem  
resultierenden Plasmid pATTPT mittels der durch das Primerpaar  
eingeführten *Sal*I und *Xba*I -Restriktionsschnittstellen isoliert  
und gelelektrophoretisch gereinigt. Für die Fusion mit dem GUS  
45 Gen wurde das ca. 2,0 kb umfassende TPT-Promotorfragment in  
den *Sal*I/*Xba*I -restringierten Binärvektor pBI101 kloniert. Die  
korrekte Insertion des richtigen Fragments im resultierenden

## 66

Plasmid pATTPT-Bi wurde anschließend anhand einer Restriktionsanalyse unter Verwendung der Endonukleasen *HindIII* verifiziert. Das Plasmid pATTPT-Bi wurde zur Tabaktransformation verwendet.

- 5 Für die Transformation in Raps wurde der TPT Promoter als *SalI* Fragment des Plasmids pATTPT in den mit *SalI* und *XhoI* geschnittenen Vektor pS3NitGUS, den Nitrilase Promotor ersetzend, kloniert.

c) Konstruktion der TPT-Promotor-PAT-Expressionskassette

10

Für die Untersuchung der TPT-Promotor gestützten Vermittlung von Resistenz gegen Phosphinothricin wurde der TPT-Promotor als *SalI* Fragment aus dem Plasmid pATTPT vor das Phosphinothricin Resistenzgen in das *SalI* geschnittene Plasmid pSUN3PatNos kloniert.

- 15 Das resultierende Plasmid pSUN3TPTPat wurde unter Verwendung des *Agrobacterium tumefaciens* Stamm EHA101 zur Tabaktransformation verwendet. Die selektive Regeneration der Tabakpflänzchen erfolgte einerseits auf Phosphinothricin (5 mg/l) und andererseits zur Kontrolle auf Kanamycin (100 mg/l).

20

d) Konstruktion der TPT-Promoter-NptII-Expressionskassette

Für die Vermittlung von Resistenz gegen Kanamycin wurde der TPT Promotor als *SalI* Fragment vor das NptII-Resistenzgen in das *XhoI* geschnittene, dephosphorylierte Plasmid pSun5NptIICat (Sungene GmbH & Co KGaA; SEQ ID NO: 24) kloniert. Das resultierende Plasmid mit der Bezeichnung pS5TPTNptII wurde in Tabak und in Raps transformiert.

- 30 e) Ergebnisse der GUS Analyse der transgenen Tabakpflanzen

Qualitative Daten

- Transgene TPT::GUS-Tabakpflanzen zeigten starke GUS-Expression in allen grünen Geweben, vor allem in 'source'-Blättern, hier insbesondere in den Trichomen und den Blütenorganen junger und voll entwickelter Blüten. Die GUS-Aktivität im Bereich der Blüten war am stärksten in den Ovarien und im Stigma; die Färbung der Kelch- und Kronblätter war etwas schwächer. In den Antheren war die GUS-Aktivität am geringsten. Im Pollen war keine GUS-Aktivität zu detektieren. Transgene Rapspflanzen zeigten das gleiche Färbemuster.

- Bei der ersten Analyse von Blattscheibchen von 80 *in vitro*-Pflanzen zeigten 22 Pflanzen überhaupt keine Färbung und 22 Pflanzen eine starke GUS-Färbung nach nur dreistündiger Färbung. Die übrigen Pflanzen zeigten eine große Bandbreite verschieden

## 67

intensiver GUS-Färbungen bei den individuellen Pflanzen. In den Gewebekulturpflanzen war die GUS-Aktivität der TPT::GUS Pflanzen deutlich stärker als die der FNR::GUS Pflanzen. Samenmaterial (F1) der Linien TPT 55 und TPT 60 wurden bezüglich ihrer GUS-Aktivität analysiert. Dabei zeigte sich, dass sowohl in ruhenden Samen als auch in ausgebrachten Keimlingen (3.5 Tage nach Aussaat) eine starke GUS-Aktivität detektiert werden konnte. In späteren Keimlingsstadien (6 und 10 Tage nach Aussaat) wurde die stärkste GUS-Aktivität in Keimblättern und im oberen Bereich der Keimlingsachse detektiert und eine schwächere GUS-Färbung in den Wurzeln. Keimlinge, die im Dunkeln angezogen wurden, zeigten ein unverändertes GUS-Färbemuster.

## Quantitative Daten

15

Die quantitative Untersuchung der GUS-Aktivität in TPT::GUS transgenen Tabakpflanzen (transformiert mit Plasmid pAT-TPT-Bi) wurde an den ersten voll entwickelten Blättern von Tabakpflanzen 19 Tage nach dem Transfer von der Gewebekultur ins Gewächshaus analysiert. Die Daten entsprechen dem Mittelwert von vier unabhängigen Messungen.

Tabelle 5: Quantifizierung der GUS-Aktivität in Blattgewebe ausgewählter transgener TPT::GUS Tabakpflanzen (transformiert mit Plasmid pAT-TPT-Bi). WT2: Kontrollwerte von untransformierten Wildtyp-Pflanzen.

| 30 | TPT::GUS<br>No. der<br>Pflanze | Rang (x-stärkste<br>GUS-Aktivität<br>unter<br>50 Pflanzen) | GUS Aktivität<br>(pmol 4-MU/mg Protein/min) | Standard-<br>abweichung |
|----|--------------------------------|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------|
|    |                                |                                                            |                                             |                         |
|    | 55                             | 1st                                                        | 62910                                       | 3576                    |
|    | 15                             | 2nd                                                        | 58251                                       | 2533                    |
|    | 10                             | 5th                                                        | 36759                                       | 1008                    |
|    | 60                             | 10th                                                       | 19536                                       | 1783                    |
| 35 | 56                             | 11th                                                       | 18876                                       | 1177                    |
|    | 43                             | 12th                                                       | 18858                                       | 1404                    |
|    | 27                             | 35th                                                       | 7390                                        | 233                     |
|    | 44                             | 59th                                                       | 311                                         | 24                      |
|    | 80-WT2                         | 80th                                                       | 5                                           | 13                      |

40

## f) Ergebnisse der GUS Analyse der transgenen Kartoffelpflanzen

Die Analyse von putativ transgenen Kartoffelpflanzen zeigte bei 28 Linien eine starke GUS Färbung in den Blättern, vergleichbar mit dem Expressionspattern der Tabakpflanzen. In den Kartoffelknollen der transgenen Pflanzen wurde ebenfalls eine starke Färbung

bung nachgewiesen. Dies zeigt, daß der TPT Promotor auch in Kartoffeln stark und ubiquitär exprimiert wird.

g) Ergebnisse der Analyse der Phosphinothricinresistenz der transgenen Tabakpflanzen

Das Plasmid pSUN3TPTPat wurde unter Verwendung des Agrobacterium tumefaciens Stamm EHA101 zur Tabaktransformation, wie unter 3. beschrieben, verwendet. Die selektive Regeneration der Tabakpflänzchen erfolgte einerseits auf Phosphinothricin (5 mg/l) und andererseits zur Kontrolle auf Kanamycin (100 mg/l). 97% der Explantate, die unter Kanamycindruck und 70% der Explantate, die unter Phosphinothricindruck selektiert wurden, entwickelten Sproßknospen. Die unter Phosphinothricindruck regenerierten Pflanzen enthielten sowohl das Kanamycin als auch das Phosphinothricinacetyltransferase Gen exprimiert hat und somit die Selektion ermöglichte. Samen der transgenen Tabakpflanzen wurden auf MS Medium, welches 10 mg/l Phosphinothricin enthielt, ausgelegt und die Keimungsrate bestimmt. Im Gegensatz zur Kontrolle mit nicht transformierten Tabaksamen entwickelten sich die Keimlinge normal. In den Nachkommenschaften der Linien wurde das übertragene und durch den TPT Promotor exprimierte Gen der Phosphinothricinacetyltransferase mittels PCR nachgewiesen. Die Ergebnisse demonstrieren, dass die isolierte Nukleinsäuresequenz die gewünschten vorteilhaften Promotoreigenschaften besitzt, d.h. sie zeigt eine Promotoraktivität, die geeignet ist Selektionsmarker effektiv zu exprimieren und weist keine Aktivität im Pollen auf.

h) Ergebnisse der Analyse der Kanamycinresistenz der transgenen Tabak- und Rapspflanzen

Für die Untersuchung der TPT-Promotor gestützten Vermittlung von Resistenz gegen Kanamycin wurde der TPT-Promotor mit dem NptII Gen kombiniert. Das resultierende Konstrukt pS5TPTNptII wurde in den Agrobacterium tumefaciens Stamm GV3101[mp90] für die Transformation in Tabak und Raps transformiert.

Die resultierenden Stämme sind für die Transformation, wie unter Beispiel 2 beschrieben, eingesetzt worden. Die selektive Regeneration wurde in Gegenwart von 100 mg/l (bzw. 18 mg/l für Raps) Kanamycin erreicht. Die unter Kanamycindruck regenerierten Pflanzen enthielten sowohl das Kanamycin als auch das Phosphinothricinacetyltransferase Gen exprimiert hat und somit die Selektion der Pflanzen ermöglichte.

Samen der transgenen Tabakpflanzen wurden auf MS Medium, welches 100 mg/l Kanamycin enthielt, ausgelegt und die Keimungsrate bestimmt. Im Gegensatz zur Kontrolle mit nicht transformierten Tabaksamen entwickelten sich die Keimlinge normal. In den Nachkom-

5 menschaften der Linien wurde das übertragene und durch den TPT Promotor exprimierte Gen der Neomycin Phosphotransferase (nptII) mittels PCR nachgewiesen.

Die Ergebnisse demonstrieren, dass die isolierte Nukleinsäure-

10 sequenz die gewünschten vorteilhaften Promotoreigenschaften besitzt, d.h. sie zeigt eine Promotoraktivität, die geeignet ist, Selektionsmarker effektiv zu exprimieren und weist keine Aktivität im Pollen auf.

15 i) Klonierung des verkürzten TPT Promotors (STPT)

Die verkürzte putative Promotorregion des TPT-Gens (STPT) aus Arabidopsis thaliana wurde durch Amplifikation mittels PCR unter Verwendung der Primer 5-TPTara (SEQ-ID NO: 26) und

20 R-TPTara (s.o., SEQ ID NO: 18) aus dem Plasmid pATTPT isoliert (SEQ ID NO: 27).

Reaktionsansatz:

|    |         |                                                                                                 |
|----|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 25 | 37,8 µl | H <sub>2</sub> O                                                                                |
|    | 5 µl    | 10X Reaktionspuffer ("genomic PCR")                                                             |
|    | 1 µl    | dNTP mix (jeweils 2,5 mM)                                                                       |
|    | 2,2 µl  | 25 mM Mg(OAc) <sub>2</sub> (Endkonzentration 1,1 mM)                                            |
|    | 1 µl    | Primer 5-TPTara (10 µM)                                                                         |
| 30 | 1 µl    | Primer R-TPTara (10 µM)                                                                         |
|    | 1 µl    | 50x Polymerase Mix ("Advantage Genomic Polymerase Mix"; Clontech Lab., Inc.; Kat.-Nr.: #8418-1) |
|    | 1 µl    | pATTPT Plasmid DNA (1 ng)                                                                       |

35 PCR-Bedingungen:

|    |    |                                                  |
|----|----|--------------------------------------------------|
|    | 1  | Zyklus mit 5 min. bei 94°C                       |
|    | 25 | Zyklen mit 94°C für 30 sec und 52°C für 1 min.   |
|    | 1  | Zyklus mit 52°C für 4 min., anschließend Kühlung |
| 40 |    | auf 4°C bis zur Weiterverarbeitung.              |

Primer 5-TPTara (SEQ-ID NO: 26)

5' -**AAG TCG ACG GAT CCT**-GAT-AGC-TTA-TAC-TCA-AAT-TCA-ACA-AGT-TAT-3'

45 Das 1,3 kb große PCR-Produkt des verkürzten TPT-Promotors wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Reinigung aus dem Gel mit dem "SureClone Ligation Kit" (Amersham Pharmacia Biotech;

Code-Nr.: 27-9300-01) in den SmaI geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pUC18 kloniert. Das resultierende Plasmid trägt die Bezeichnung pATSTPT. Die Sequenz wurde mittels Sequenzierung überprüft.

5

j) Konstruktion der STPT-Promoter-NptII-Expressionskassette

Für die Vermittlung von Resistenz gegen Kanamycin wurde der STPT Promotor (SEQ ID NO: 27) als SalI Fragment vor das NptII-Resistenzgen in das XhoI geschnittene, dephosphorylierte Plasmid pSun5NptIICat (Sungene GmbH & Co KGaA; SEQ ID NO: 24) kloniert. Das resultierende Plasmid mit der Bezeichnung pS5STPTNptII wurde in Tabak und in Raps transformiert.

15 k) Ergebnisse der Analyse der Kanamycinresistenz der transgenen Tabak- und Rapspflanzen

Für die Untersuchung der STPT-Promotor gestützten Vermittlung von Resistenz gegen Kanamycin wurde das Plasmid pS5STPTNptII in den Agrobakterium tumefaciens Stamm GV3101[mp90] für die Transformation in Tabak und Raps transformiert. Der resultierenden Stamm ist für die Transformation, wie unter Beispiel 2 beschrieben, eingesetzt worden. Die selektive Regeneration wurde in Gegenwart von 100 mg/l (bzw. 18 mg/l für Raps) Kanamycin erreicht.

Die Ergebnisse demonstrieren, dass die isolierte Nukleinsäuresequenz die gewünschten vorteilhaften Promotoreigenschaften besitzt, d.h. sie zeigt eine Promotoraktivität, die geeignet ist, Selektionsmarker effektiv zu exprimieren.

Beispiel 6: Vergleich der Transformationseffizienz von FNR- und TPT-Promotor mit dem NOS-Promotor

35

In einem vergleichenden Experiment wurde die Effizienz bei der Transformation von Tabak unter der Verwendung des FNR-Promotors (FNR-P), des TPT-Promotors (TPT-P) und des Nos-Promotors (Nos-P) bestimmt. Die Promotoren waren, wie beschrieben, mit dem NptII Gen jeweils fusioniert. Nach erfolgter Sproßknospenbildung bzw. der Bewurzelung der Sprosse auf kanamycinhaltigen Medium wurden die resistenten Transformanten gezählt und deren Zahlen verglichen. Eine PCR, mit der das NptII Gen nachgewiesen wurde, zeigte den hohen Anteil der transgenen Pflanzen.

45

## 71

|                      | NOS-P | FNR-P | TPT-P |
|----------------------|-------|-------|-------|
| Sprossbildung        | 100 % | 68 %  | 76 %  |
| Bewurzelte Pflanzen  | 80 %  | 81 %  | 80 %  |
| 5 Transgene Pflanzen | 92 %  | 100 % | 100 % |

Tabelle 6: Transformationseffizienz

- 10 Vergleichsbeispiel 1: Untersuchungen zur Eignung des Ubiquitin-Promotors

a) Klonierung des Ubiquitin Promotor aus *Arabidopsis thaliana*

- 15 Der Ubiquitin Promotor wurde mittels PCR aus genomischer *Arabidopsis thaliana* DNA mit den Primern ubi5 und ubi3 amplifiziert.

ubi5 (SEQ ID NO: 19) :

20 5'-CCAAACCATGGTAAGTTTGTCTAAAGCTTA-3'

ubi3 (SEQ ID NO: 20):

5'-CGGATCCTTTTGTGTTTCGTCTTCTCTCACG-3'

- 25 Reaktionsansatz:

37,5 µl H<sub>2</sub>O  
 5 µl 10X Reaktionspuffer ("genomic PCR")  
 4 µl dNTP mix (jeweils 2,5 mM)  
 2,2 µl 25 mM Mg(OAc)<sub>2</sub> (Endkonzentration 1,1 mM)  
 30 1 µl Primer ubi3 (10 µM)  
 1 µl Primer ubi5 (10 µM)  
 0,5 µl Pfu-turbo polymerase mix  
 1 µl Genomische *Arabidopsis* DNA (ca. 250 ng)

- 35 PCR-Bedingungen:

1 Zyklus mit 5 min. bei 94°C  
 25 Zyklen mit 94°C für 30 sec, 52°C für 1 min. und 72°C für 1 min.  
 40 1 Zyklus mit 52°C für 1 min. und 72°C für 10 min., anschließend Kühlung auf 4°C bis zur Weiterverarbeitung.

- Das entstandene PCR Fragment wurde als *Hind*III/*Bam*HI Fragment in das mit *Hind*III/*Bam*HI geschnittene Plasmid pGUSINT37 kloniert  
 45 (pUBI42GUS) und mittels Sequenzanalyse verifiziert.

## 72

## b) Klonierung des Ubiquitin Promotors vor das PAT-Gen

Für die Untersuchung der Ubiquitin-Promotor gestützten Vermittlung von Resistenz gegen Phosphinothricin wurde der Ubiquitin  
 5 -Promotor als *Bam*HI/*Hind*III Fragment vor das Phosphinothricin Resistenzgen in das *Bam*HI/*Hind*III geschnittene Plasmid pSUN3Pat-Nos kloniert. Das resultierende Plasmid pSUN3UBIPat wurde unter Verwendung des *Agrobacterium tumefaciens* Stamm EHA101 zur Tabaktransformation verwendet. Die selektive Regeneration der Tabakpflänzchen erfolgte einerseits auf Phosphinothricin (5 mg/l) und  
 10 andererseits zur Kontrolle auf Kanamycin (100 mg/l).

## c) Ergebnisse der Analyse der Phosphinothricinresistenz der transgenen Tabakpflanzen

15

Im Gegensatz zur Selektion auf Kanamycin, die normal verlief, konnten unter Selektion auf Phosphinothricin keine Kalli oder Sprosse erhalten werden. So ist der Ubiquitin Promotor nicht geeignet für die Expression eines selektiven Markers für den *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Gentransfer mit anschließender  
 20 Regeneration von Geweben.

## Vergleichsbeispiel 2: Untersuchungen zur Eignung des Squalen Synthase (SQS) Promotors

25

a) Klonierung des Squalen Synthase (SQS) Promotors aus *Arabidopsis thaliana*

Der Squalen Synthase Promotor wurde mittels PCR aus genomischer  
 30 *Arabidopsis thaliana* DNA mit den Primern sqs5 und sqs3 amplifiziert.

sqs5 (SEQ ID NO: 21):

5'-GTCTAGAGGCAAACCAACCGAGTGTT-3'

35

sqs3 (SEQ ID NO: 22):

5'-CGGTACCTGTTTCCAGAAAATTTTGATTTCAG-3'

## Reaktionsansatz:

40

|    |         |                                                      |
|----|---------|------------------------------------------------------|
|    | 37,5 µl | H <sub>2</sub> O                                     |
|    | 5 µl    | 10X Reaktionspuffer ("genomic PCR")                  |
|    | 4 µl    | dNTP mix (jeweils 2,5 mM)                            |
|    | 2,2 µl  | 25 mM Mg(OAc) <sub>2</sub> (Endkonzentration 1,1 mM) |
| 45 | 1 µl    | Primer sqs3 (10 µM) (10 µM)                          |
|    | 1 µl    | Primer sqs5 (10 µM)                                  |
|    | 0,5 µl  | Pfu-turbo polymerase mix                             |

## 73

1 µl                    Genomische *Arabidopsis* DNA (ca. 250 ng)

PCR-Bedingungen:

- 5            1    Zyklus mit 5 min. bei 94°C  
25           25    Zyklen mit 94°C für 30 sec, 52°C für 1 min. und 72°C  
                 für 1 min.  
                 1    Zyklus mit 52°C für 1 min. und 72°C für 10 min., an-  
                         schließend Kühlung auf 4°C bis zur Weiterverarbeitung.

10

Das entstandene PCR Fragment wurde als *Xba*II/*Bam*HI Fragment in das mit *Xba*II/*Bam*HI geschnittene Plasmid pGUSINT37 kloniert (pSQSPGUS) und mittels Sequenzanalyse verifiziert.

- 15 b)    Klonierung des Squalen Synthase Promotors vor das PAT-Gen

- Für die Untersuchung der Squalen Synthase -Promotor gestützten Vermittlung von Resistenz gegen Phosphinothricin wurde der Squalen Synthase-Promotor als *Bam*HI/*Sal*I Fragment vor das  
20 Phosphino-thricin Resistenzgen in das *Bam*HI/*Sal*I geschnittene Plasmid pSUN3PatNos kloniert. Das resultierende Plasmid pSUN3SQSPat wurde unter Verwendung des *Agrobacterium tumefaciens* Stamm EHA101 zur Tabaktransformation verwendet. Die selektive Regeneration der Tabakpflänzchen erfolgte einerseits auf  
25 Phosphinothricin (5 mg/l) und andererseits zur Kontrolle auf Kanamycin (100 mg/l).

- c)    Ergebnisse der Analyse der Phosphinothricinresistenz der transgenen Tabakpflanzen

30

- Im Gegensatz zur Selektion auf Kanamycin, die normal verlief, konnten unter Selektion auf Phosphinothricin keine Kalli oder Sprosse erhalten werden. So ist der Ubiquitin Promotor nicht geeignet für die Expression eines selektiven Markers für den  
35 *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Gentransfer mit anschließender Regeneration von Geweben.

- Vergleichsbeispiel 3:            Testung der Promotoraktivität des Ubiquitin- und Squalen Synthase-Promotors mittels Partikelkanone  
40

- Um transient die Aktivität des Ubiquitin- und des Squalen Synthase-Promotors zu testen, wurden sterile Tabakblätter mit Plasmid-DNA der Plasmide pUBI42GUS, pSQSPGUS und pGUSINT37 mit  
45 der Partikelkanone "Biolistics" von BioRad beschossen. Dabei wurden Microcarrier (25 µg Gold, Hereus 0,3 bis 3 µm) mit 10 µg Plasmid DNA, 2,5 M CaCl<sub>2</sub>, und 0,1 M Spermidine behandelt, mit

## 74

Alkohol gewaschen und bei einem Vakuum von 26 inch und einem Druck von 1100 psi auf die Blätter, die auf MS-Agarmedium lagen, geschossen. Die Explantate wurden anschließend für 24 h in MS-Medium mit 2% Sucrose inkubiert und dann mit X-gluc histochemisch 5 gefärbt.

Der Ubiquitin-Promotor und der Squalen Synthase-Promotor zeigten hierbei im Gegensatz zum Vergleichskonstrukt pGUSINT37, wo das GUS Gen unter der Kontrolle des 35S Promotors exprimiert wurde, 10 nur sehr wenige und sehr schwache Punkte mit GUS-Färbung. Dies zeigt, dass die Aktivität des Ubiquitin- und des Squalen Synthase-Promotors deutlich schwächer ist, als die des CaMV35S-Promotors.

15

20

25

30

35

40

45

## Patentansprüche

1. Expressionskassette zur transgenen Expression von Nukleinsäuren enthaltend
- 5
- a) einen Promotor gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 oder
- b) funktionelle Äquivalente oder äquivalente Fragmente von
- 10 a), die im wesentlichen die gleichen Promotoraktivitäten wie a) besitzen,
- wobei a) oder b) funktionell mit einer transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz verknüpft sind.
- 15
2. Expressionskassette nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das funktionell äquivalente Fragment ausgewählt ist aus der Gruppe von Sequenzen beschrieben durch SEQ ID NO: 4 und
- 20 27.
3. Expressionskassette nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass
- a) die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz mit weiteren
- 25 genetischen Kontrollsequenzen funktionell verknüpft ist, oder
- b) die Expressionskassette zusätzliche Funktionselemente enthält, oder
- 30 c) a) und b) gegeben sind.
4. Expressionskassette nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz
- 35
- a) die Expression eines von besagter Nukleinsäuresequenz kodierten Proteins, oder
- b) die Expression eines von besagter Nukleinsäuresequenz kodierter sense oder anti-sense-RNA ermöglicht.
- 40

## 76

5. Expressionskassette nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz ausgewählt ist aus Nukleinsäuren kodierend für Selektionsmarker, Reportergene, Cellulasen, Chitinasen, Glucanasen, Ribosom-
- 5 inaktivierende Proteine, Lysozyme, *Bacillus thuringiensis* Endotoxin,  $\alpha$ -Amylaseinhibitor, Proteaseinhibitoren, Lektine, RNAasen, Ribozyme, Acetyl-CoA-carboxylasen, Phytasen, das 2S Albumin aus *Bertholletia excelsa*, "antifreeze"-Proteinen, Trehalosephosphatsynthase, Trehalosephosphatphosphatase,
- 10 Trehalase, DREB1A-Faktor, Farnesyltransferasen, Ferritin, Oxalatoxidase, Calcium-abhängigen Proteinkinasen, Calcineurinen, Glutamatdehydrogenasen, das N-hydroxylierende, multifunktionelle Cytochrom P-450, den transkriptionellen Aktivator CBF1, Phytoendesaturasen, Polygalakturonasen,
- 15 Flavonoid-3'-hydroxylasen, Dihydroflavanol-4-reduktasen, Chalconisomerasen, Chalconsynthasen, Flavanon-3-beta-hydroxylasen, Flavonsynthase II, Verzweigungsenzym Q, "Starch Branching" Enzyme.
- 20 6. Expressionskassette nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz ausgewählt ist aus der Gruppe der Nukleinsäuresequenzen mit den Genbank Accession-Nummern U77378, AF306348, A19451, L25042, S78423, U32624, X78815, AJ002399, AF078796, AB044391, AJ222980,
- 25 X14074, AB045593, AF017451, AF276302, AB061022, X72592, AB045592, AR123356.
7. Expressionskassette nach einem der Ansprüche 1 bis 4 wobei die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus positiven Selektionsmarkern,
- 30 negativen Selektionsmarkern und Faktoren die einen Wachstumsvorteil gewähren.
8. Expressionskassette nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Selektionsmarker ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Proteinen, die eine Resistenz gegen Antibiotika, Metabolismus-Inhibitoren, Herbizide oder Biozide verleihen.
- 35 9. Expressionskassette nach einem der Ansprüche 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Selektionsmarker ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Proteinen, die eine Resistenz verleihen gegen Phosphinothricin, Glyphosat, Bromoxynil, Dalapon, 2-Desoxyglucose-6-phosphat, Tetracycline, Ampicillin, Kanamycin, G 418, Neomycin, Paromomycin, Bleomycin, Zeocin, Hygromycin, Chloramphenicol, Sulfonharnstoff-Herbizide, Imidazolinon-Herbizide.
- 40 45

10. Transgene Expressionskassette nach einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Selektionsmarker ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Phosphinothricinacetyltransferasen, 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthasen, Glyphosatoxidoreduktasen, Dehalogenase, Nitrilasen, Neomycinphosphotransferasen, DOG<sup>R</sup>1-Genen, Acetolactatsynthasen, Hygromycinphosphotransferasen, Chloramphenicolacetyltransferasen, Streptomycinadenylyltransferasen,  $\beta$ -Lactamasen, tetA Genen, tetR Genen, Isopentenyltransferasen, Thymidinkinasen, Diphtheriatoxin A, Cytosindeaminase (codA), Cytochrom P450, Haloalkandehalogenasen, iaaH Gene, tms2 Gene,  $\beta$ -Glucuronidasen, Mannose-6-phosphat-Isomerasen, UDP-Galaktose-4-Epimerasen.
11. Transgene Expressionskassette nach einem der Ansprüche 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Selektionsmarker kodiert wird durch Nukleinsäuresequenzen
- i) beschrieben durch SEQ ID NO: 5 oder 6, oder
- ii) beschrieben durch oder enthalten in den Sequenzen beschrieben durch die GenBank Acc.-No.: X17220, X05822, M22827, X65195, AJ028212, X17220, X05822 M22827, X65195, AJ028212, X63374, M10947, AX022822, AX022820, E01313, J03196, AF080390, AF234316, AF080389, AF234315, AF234314, U00004, NC001140, X51514, AB049823, AF094326, X07645, X07644, A19547, A19546, A19545, I05376, I05373, X74325, AF294981, AF234301, AF234300, AF234299, AF234298, AF354046, AF354045, X65876, X51366, AJ278607, L36849, AB025109, AL133315.
12. Vektoren enthaltend eine Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11.
13. Verfahren zur transgenen Expression von Nukleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, dass eine Nukleinsäuresequenz in funktioneller Verknüpfung mit
- a) einen Promotor gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 oder
- b) einem funktionellen Äquivalent oder äquivalenten Fragment von a), das im wesentlichen die gleichen Promotoraktivitäten wie a) besitzt,
- transgen exprimiert wird.

## 78

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass das funktionell äquivalente Fragment ausgewählt ist aus der Gruppe von Sequenzen beschrieben durch SEQ ID NO: 4 und 27.
- 5 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass
- 10 a) die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz mit weiteren genetischen Kontrollsequenzen funktionell verknüpft ist, oder
- b) eine verwendete Expressionskassette zusätzliche Funktionselemente enthält, oder
- 15 c) a) und b) gegeben sind.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz
- 20 a) die Expression eines von besagter Nukleinsäuresequenz kodierten Proteins, oder
- b) die Expression eines von besagter Nukleinsäuresequenz kodierter sense oder anti-sense-RNA ermöglicht.
- 25 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 16, wobei die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz ausgewählt ist aus Nukleinsäuren kodierend für Selektionsmarker, Reportergene, Cellulasen, Chitinasen, Glucanasen, Ribosom-inaktivierende Proteine, Lysozyme, Bacillus thuringiensis Endotoxin,  $\alpha$ -Amylaseinhibitor, Proteaseinhibitoren, Lektine, RNAasen, Ribozyme, Acetyl-CoA-carboxylasen, Phytasen, das 2S Albumin aus Bertholletia excelsa, "antifreeze"-Proteinen, Trehalosephosphatsynthase, Trehalosephosphatphosphatase, Trehalase, DREB1A-Faktor, Farnesyltransferasen, Ferritin, Oxalatoxidase, Calcium-abhängigen Proteinkinasen, Calcineurinen, Glutamatdehydrogenasen, das N-hydroxylierende, multifunktionelle Cytochrom P-450, den transkriptionellen Aktivator CBF1, Phytoendesaturasen, Polygalakturonasen, Flavonoid-3'-hydroxylasen, Dihydroflavanol-4-reduktasen, Chalconisomerasen, Chalconsynthasen, Flavanon-3-beta-hydroxylasen, Flavonsynthase II, Verzweigungsenzym Q, "Starch Branching" Enzyme.
- 30 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 17, wobei die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz ausgewählt ist aus der Gruppe der Nukleinsäuresequenzen mit den Genbank
- 35 40 45

Accession-Nummern U77378, AF306348, A19451, L25042, S78423, U32624, X78815, AJ002399, AF078796, AB044391, AJ222980, X14074, AB045593, AF017451, AF276302, AB061022, X72592, AB045592, AR123356.

5

19. Verfahren zur Selektion transformierter Organismen, dadurch gekennzeichnet, dass eine Nukleinsäuresequenz kodierend für einen Selektionsmarker in funktioneller, transgener Verknüpfung mit

10

a) einem Promotor gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3, oder

b) einem funktionellen Äquivalent oder äquivalenten Fragment von a), das im wesentlichen die gleichen Promotoraktivitäten wie a) besitzt,

15

in einen Organismus eingebracht wird, die Expression des Selektionsmarkers erfolgt und eine Selektion ausgeübt wird.

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass der Selektionsmarker ausgewählt ist aus den in den Ansprüchen 6, 7, 8, 9 oder 10 genannten Gruppen von Selektionsmarkern.

21. Transgener Organismus transformiert mit einer Expressionskassette gemäß den Ansprüchen 1 bis 11 oder einem Vektor gemäß Anspruch 12.

25

22. Transgener Organismus nach Anspruch 21 ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bakterien, Hefen, Pilzen, tierischen und pflanzlichen Organismen.

30

23. Transgener Organismus nach einem der Ansprüche 21 oder 22 ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Arabidopsis, Tomate, Tabak, Kartoffeln, Mais, Raps, Weizen, Gerste, Sonnenblumen, Hirse, Rübe, Roggen, Hafer, Zuckerrübe, Bohnengewächse und Soja.

35

24. Zellkulturen, Teile oder transgenes Vermehrungsgut abgeleitet von einem transgenen Organismus nach einem der Ansprüche 21 bis 23.

40

25. Verwendung eines transgenen Organismus nach einem der Ansprüche 21 bis 23 oder von diesem abgeleitete Zellkulturen, Teile oder transgenes Vermehrungsgut nach Anspruch 24 zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

45

## 80

26. Verwendung nach Anspruch 25, wobei die Feinchemikalien Enzyme, Vitamine, Aminosäuren, Zucker, gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren, natürliche oder synthetische Geschmacks-, Aroma- oder Farbstoffe sind.

5

27. Verwendung nach Anspruch 25, wobei das Pharmazeutikum ein Antikörper, Enzym oder pharmazeutisch aktives Protein ist.

28. Verfahren zur Herstellung von Pharmazeutika oder Feinchemikalien in transgenen Organismen nach einem der Ansprüche 21 bis 23 oder von diesen abgeleiteten Zellkulturen, Teilen oder transgenes Vermehrungsgut nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass der transgene Organismus gezüchtet und das gewünschte Pharmazeutikum oder die gewünschte Feinchemikalie isoliert wird.

15

29. Verfahren nach Anspruch 28, wobei die Feinchemikalien Enzyme, Vitamine, Aminosäuren, Zucker, gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren, natürliche oder synthetische Geschmacks-, Aroma- oder Farbstoffe sind.

20

30. Verfahren nach Anspruch 28, wobei das Pharmazeutikum ein Antikörper, Enzym oder pharmazeutisch aktives Protein ist.

25

30

35

40

45

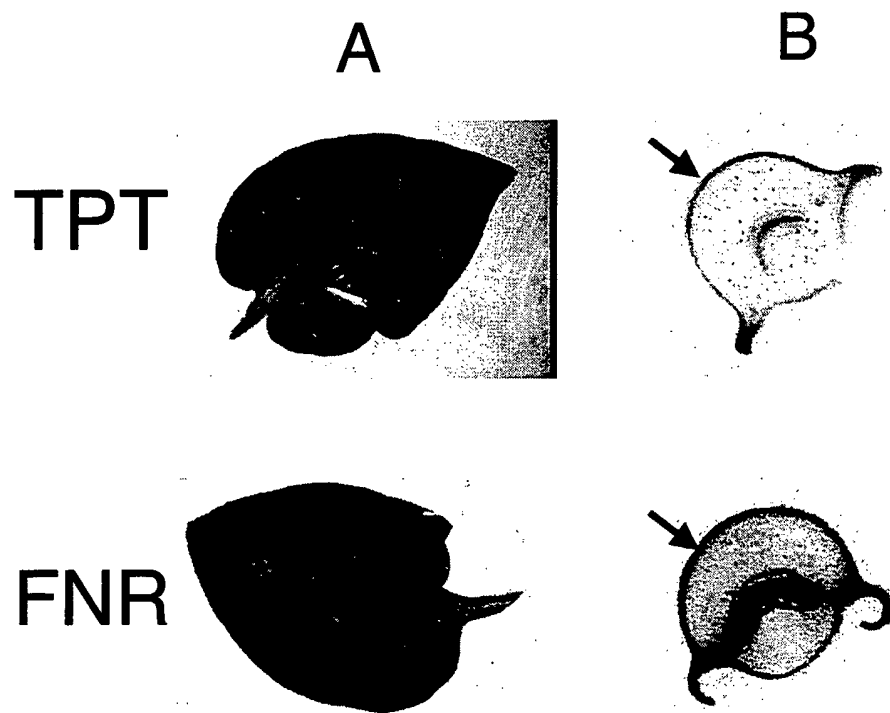


Fig. 1a

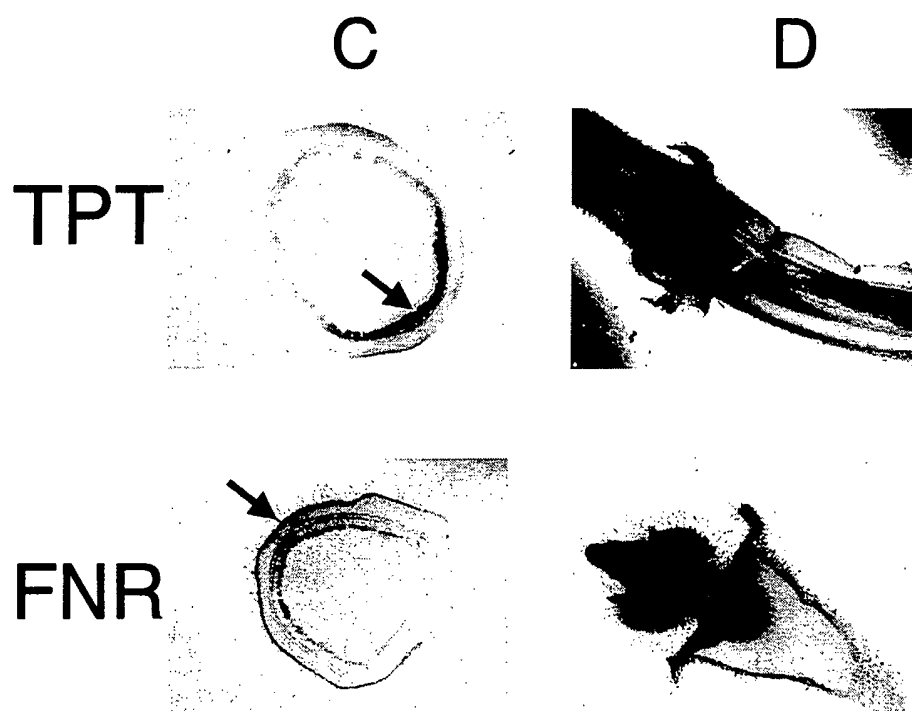


Fig. 1b

3 / 8

E

TPT



FNR

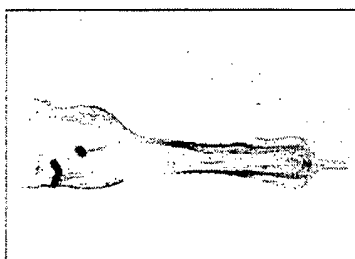


Fig. 1c

4/8

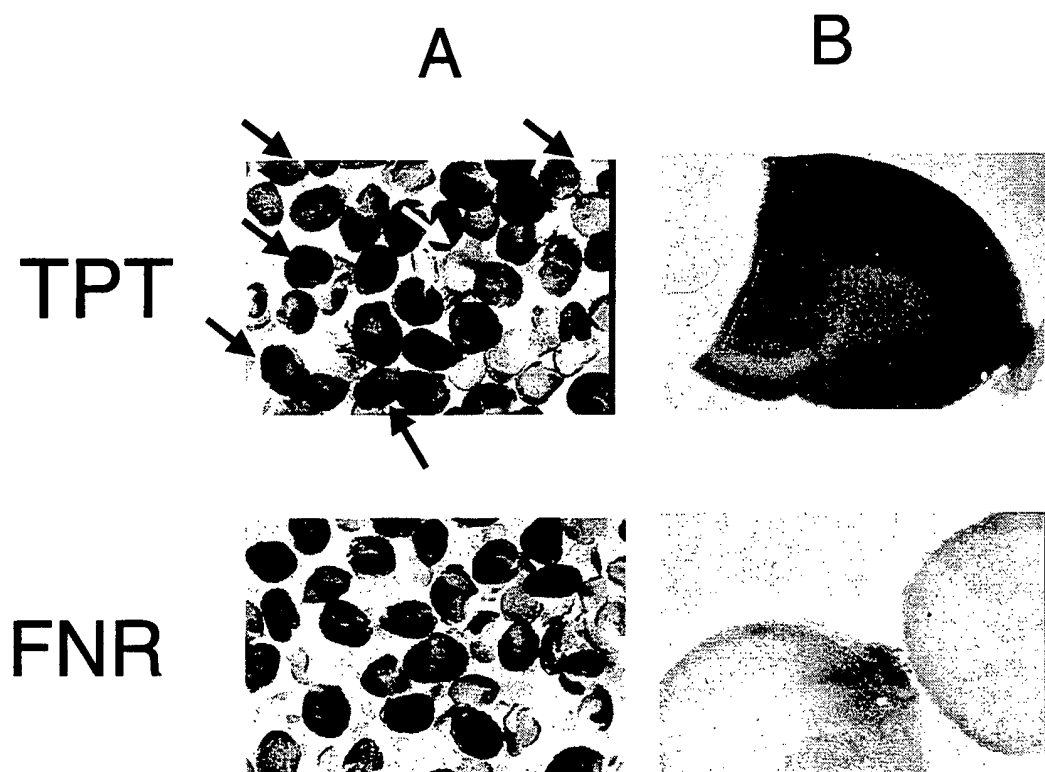


Fig. 2a

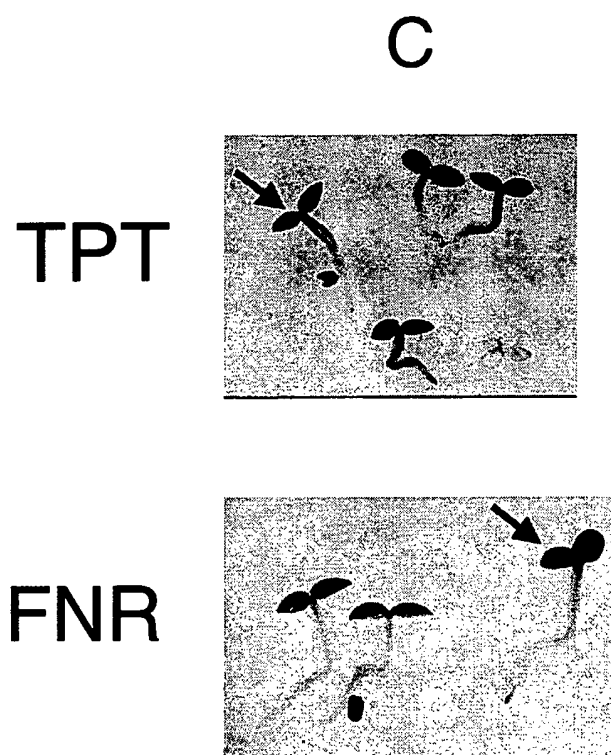


Fig. 2b

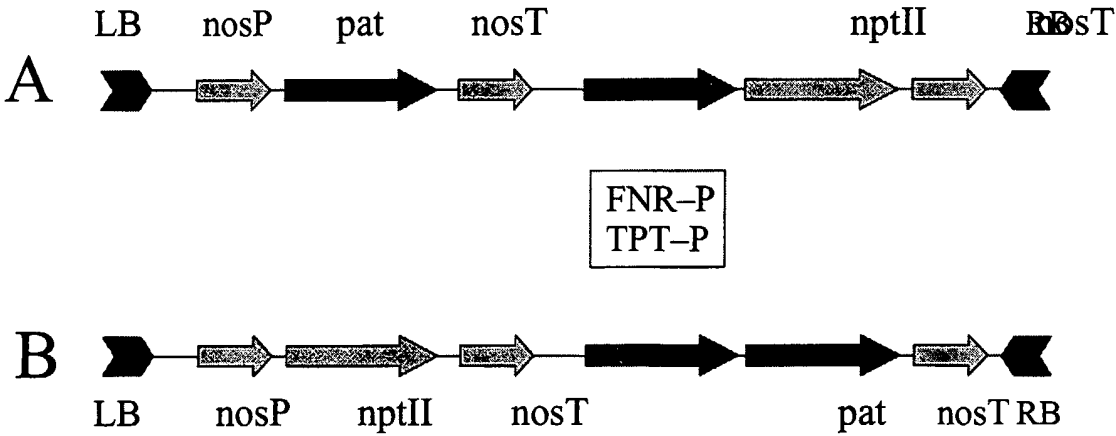


Fig. 3

7/8

A

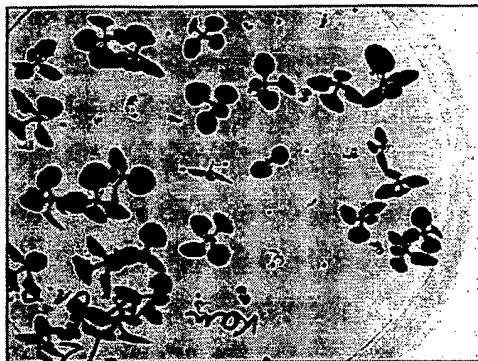


B

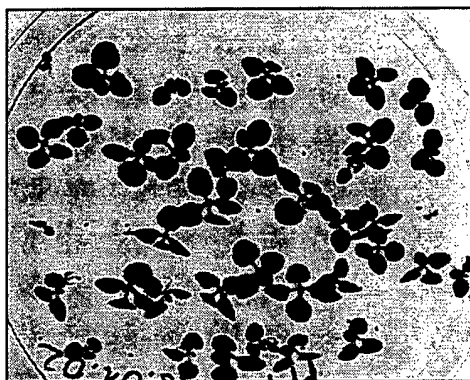


Fig. 4

A



B



C

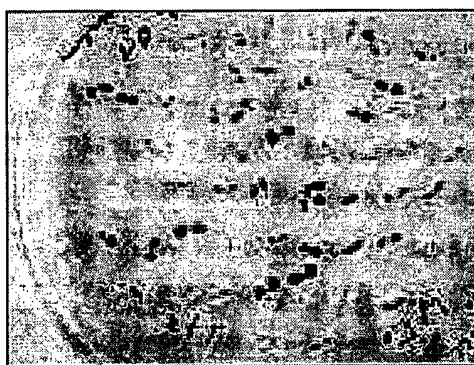


Fig. 5

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; SunGene GmbH &amp; Co KGaA

<120> Expressionskassetten zur transgenen Expression von  
Nukleinsäuren

&lt;130&gt; NAE3614/2001

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 29

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 836

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; promoter

&lt;222&gt; (1)..(836)

&lt;223&gt; pFD promoter

&lt;400&gt; 1

```

gattcaagct tcactgctta aattcacaaa aagagaaaag taagaccaa ggaataaatc 60
atcctcaaac caaaaacaca tcatacaaaa tcatcaaaca taaatctcca gatgtatgag 120
caccaatcca gttatacaac actcttaaca ccaaatcaac agatttaaca gcgaaataag 180
cttaagccca tacaattatc cgatccaaac aaatataatc gaaaccggca gaggaataag 240
caagtgaatc aaaaagtatg ggacgaggaa gaagatgata cctgaatgag aaagtcaata 300
accttgacct gaatcgtttt gaagaaaatg gagaaaatcg gttgtatgga ataaaaatctt 360
cgaatgatga gatatatgat ctctttggtg tcagtcacat ggcacacgct atcaatttag 420
aaaaacgcgg tggttggtca ccagaattac tacttctcgg tctgatttgg tcatatccgt 480
attaagtcgg gttaatatatt tccataactg gggtttgaac attcggtttc tttttttcag 540
ttagtccgat ttggagtatt gagtatggaa aaataatact gaatttatatt gttcaaactg 600
ttttggaaaa aatattttccc ttaattacga atataattaa aattttaaaa ttcattttat 660
tagatcttgg ttaattcggg ttaatgcatt aatgaatttc ggtttaagtc ggttttcggg 720
ttttatgtcc caccactatc tacaaccgat gatcaacctt atctcgtat tcaccacaaa 780
cagtcacac tctcacttga cacaaaaact cttttgtctc cgtctctctg tctctc 836

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 635

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; promoter

&lt;222&gt; (1)..(635)

&lt;223&gt; FNR promoter

&lt;400&gt; 2

```

ttcattatatt cgattttgat ttcgtgacca gcgaacgcag aataccttgt tgtgtaatac 60
tttaccctgt taaatcaaaa acaaaaaggc ttttgagctt tttgtagttg aattttctctg 120
gctgatcttt tctgtacaga ttcatatatc tgcagagacg atatcattga ttatttgagc 180
ttcttttgaa ctatttcgtg taatttgagg tgagagctct atgtatgtgt gtaaactttg 240
aagacaacaa gaaaggtaac aagtgaaggga gggatgactc catgtcaaaa tagatgtcat 300
aagaggccca tcaataagtg cttgagccca ttagctagcc cagtaactac cagattgtga 360
gatggatgtg tgaacagttt tttttttgat gtaggactga aatgtgaaca acaggcgcac 420
gaaaggctaa attaggacaa tgataagcag aaataactta tcctctctaa cacttggcct 480
cacattgccc ttcacacaat ccacacacat ccaatcacia cctcatcata tatctccgc 540
taatcttttt ttctttgatc tttttttttt tgcttattat ttttttgact ttgatctccc 600
atcagttcat cttcttcttc ttcttctgat caacc 635

```

<210> 3  
 <211> 2038  
 <212> DNA  
 <213> Arabidopsis thaliana  
 <220>  
 <221> promoter  
 <222> (1)..(2038)  
 <223> TPT promoter

<400> 3  
 ataacaaaaa gaactctgat catgtacgta cccatttgcg tattccgccg ttgcggaatc 60  
 aaaaactgcc atagacttct ccacatcttt ttcagctcgc atcagtttga taacctgtga 120  
 aggcgtgatg ttctttgacc acttgaacat catcactttg ttaccatta ctaaacaatg 180  
 ataccttcca acaatagcaa agaatacacc tttttataga gaagaatctc agctacgcac 240  
 tacgtcgaac aggttgtgtg cataaacgat ttcgataggc ccaaaccaaa tgaaagaaac 300  
 acagaccaga aaaatcattt gatcttcaaa acatacgagt tccaaaagtg aaggaagcaa 360  
 caatgaaact cgttacgaac tagaaggtta atcaaattgc cggagaagaa tcgctcacca 420  
 gttttggcta gggtttatga aatgggagac tttagctgca aagagaagag tctctggacg 480  
 atttagaggg tgtctctcta ataggcaaca aagtacatat tattacagta ttaaccaa 540  
 ttaaacgaat taagtgtcaa caaaagctta tataaaaaat ttaaagttta aaaattataa 600  
 aatatgtcaa caatatttta gtacttaaaa ttattatgcy aaatatttag atcaatggac 660  
 tactcatcta atatatgtgc acctaat tttt aaagtataaa ttcaaccaat aattagaaaa 720  
 tgatagctta tactcaaatt caacaagtta tatataaatg tatagatact acaatatcat 780  
 taacaaaagt caccttaa ataaacacat atcttttatg ttctctattg ttttgcgta 840  
 gctaacacaa tttctcatat gcaaaaggat gaatgagtaa caaattacct cataagaaca 900  
 atcatctttg cttacatact aatacaataa tcaactcaatc aaccaataac atcaatcaca 960  
 taggtttaca tacaataatc actcaatcaa cttcataaga agaatacatgt ttacttaatt 1020  
 catcaattat ccccaaaaac accactatta agtataaact ataacatatt tgtagtgatg 1080  
 ggccaacatt tttatcatat ttaaaactcg gttccctcaa atcgagaaat agtgaacatg 1140  
 taatattaat tttaaatcgc aattacagaa attaatgaa tttgggtcaa tggacagaat 1200  
 tttatagatt ggggtggaact agaaaaaaa aaaaaaagag tatagggtga attgagtaca 1260  
 tgaaagtaca tggaatcct agttaaacgc ataatacatg tgggttcatt tgtatttttt 1320  
 tgtaacttac gagtaaactg gctacaacaa aaaaaattag aagatttttt tgtttttag 1380  
 aaaaccctaa ttttagttat agttgtataa ctttgataaa attataaaat tgtattacga 1440  
 aaaaagtaat aagatattca aaaaagccta gaataacgta tatgactatg agcatgaaac 1500  
 tgcaagtcaa atgctgacag acaaccataa acaaaaagaa ttaaataagag atacctttta 1560  
 aataagtaaa atttcatttta taaaaaatct actttcttgt gaatctgtca cgttcaataa 1620  
 tttgaagacc actcaacata caaggtaaat aatgaaaaat aaaatctacc aaaatttcaa 1680  
 tcattattat cttccaaaaa aacaaaatta tacagatgat gatgggtgata tggaaacttcg 1740  
 attggcta atactactgtg tctctaaaaa ccatccactt atcaagataa gatggaccct 1800  
 aactcatcc aatctaaacc agtatctcaa gattcttacc taattacatc attctctacc 1860  
 gttagatgaa attgaccatt aaccctacca taactccata caccgagaga tactggatta 1920  
 accaaatcga gatcatcgta gccgtccgat caacaagtac catctcttga aatactcgaa 1980  
 atcctcataa gtcgctccct ctttgcctct actatcaaaa ctctgaattt cgatttca 2038

<210> 4  
 <211> 699  
 <212> DNA  
 <213> Arabidopsis thaliana  
 <220>  
 <221> promoter  
 <222> (1)..(699)  
 <223> FDS promoter

<400> 4  
 aacactctta acaccaaact aacagattta acagcgaat aagcttaagc ccatacaatt 60  
 atccgatcca aacaaatata atcgaaaccg gcagaggaat aagcaagtga atcaaaaagt 120  
 atgggacgag gaagaagatg atacctgaat gagaaagtca ataaccttga cccgaatcgt 180  
 tttgaagaaa atggagaaaa tcggttgtat ggaataaaat cttcgaatga tgagatatat 240

```

gatctcttttg gtgtcagtca catggcacac gctatcaatt tagaaaaacg cgggtggttgg 300
tcaccagaat tactacttct cggctctgatt tggatcatatc cgtattaagt cgggttaata 360
ttttccataa ctgggggtttg aacattcggg tttttttttt cagttagtcc gatttggagt 420
tttgagtatg gaaaaataat actgaattta tttgttcaaa ctgttttggg aaaaatattt 480
cccttaatta cgaatataat taaaatttta aaattcattt tattagatct tgggttaattc 540
ggtttaaatgc attaatgaat ttcggtttaa gtcgggttttc ggtttttatg tcccaccact 600
atctacaacc gatgatcaac cttatctccg tattcaccac aaacagtcac cactctcact 660
tgacacaaaa actcttttgt ctccgtctct ctgtctctc 699

```

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 552

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: codon  
adapted sequence for  
phosphinotricin-N-acetyltransferase

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(549)

&lt;223&gt; phosphinotricin-N-acetyltransferase (PAT)

&lt;400&gt; 5

```

atg tct ccg gag agg aga cca gtt gag att agg cca gct aca gca gcc 48
Met Ser Pro Glu Arg Arg Pro Val Glu Ile Arg Pro Ala Thr Ala Ala
  1             5             10             15

gat atg gcc gcg gtt tgt gac atc gtt aac cat tac att gag acg tct 96
Asp Met Ala Ala Val Cys Asp Ile Val Asn His Tyr Ile Glu Thr Ser
             20             25             30

aca gtg aac ttt agg aca gag cca caa aca cca caa gag tgg att gat 144
Thr Val Asn Phe Arg Thr Glu Pro Gln Thr Pro Gln Glu Trp Ile Asp
             35             40             45

gac cta gag agg ttg caa gat aga tac cct tgg ttg gtt gct gag gtt 192
Asp Leu Glu Arg Leu Gln Asp Arg Tyr Pro Trp Leu Val Ala Glu Val
             50             55             60

gag ggt gtt gtg gct ggt att gct tac gct ggg ccc tgg aag gct agg 240
Glu Gly Val Val Ala Gly Ile Ala Tyr Ala Gly Pro Trp Lys Ala Arg
             65             70             75             80

aac gct tac gat tgg aca gtt gag agt act gtt tac gtg tca cat agg 288
Asn Ala Tyr Asp Trp Thr Val Glu Ser Thr Val Tyr Val Ser His Arg
             85             90             95

cat caa agg ttg ggc cta gga tct aca ttg tac aca cat ttg ctt aag 336
His Gln Arg Leu Gly Leu Gly Ser Thr Leu Tyr Thr His Leu Leu Lys
             100             105             110

tct atg gag gcg caa ggt ttt aag tct gtg gtt gct gtt ata ggc ctt 384
Ser Met Glu Ala Gln Gly Phe Lys Ser Val Val Ala Val Ile Gly Leu
             115             120             125

cca aac gat cca tct gtt agg ttg cat gag gct ttg gga tac aca gcg 432
Pro Asn Asp Pro Ser Val Arg Leu His Glu Ala Leu Gly Tyr Thr Ala
             130             135             140

cgg ggt aca ttg cgc gcg gct gga tac aag cat ggt gga tgg cat gat 480
Arg Gly Thr Leu Arg Ala Ala Gly Tyr Lys His Gly Gly Trp His Asp
145             150             155             160

```

gtt ggt ttt tgg caa agg gat ttt gag ttg cca gct cct cca agg cca 528  
 Val Gly Phe Trp Gln Arg Asp Phe Glu Leu Pro Ala Pro Pro Arg Pro  
                   165                  170                  175

gtt agg cca gtt acc cag atc tga 552  
 Val Arg Pro Val Thr Gln Ile  
                   180

<210> 6

<211> 183

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: codon  
 adapted sequence for  
 phosphinotricin-N-acetyltransferase

<400> 6

Met Ser Pro Glu Arg Arg Pro Val Glu Ile Arg Pro Ala Thr Ala Ala  
   1                  5                  10                  15

Asp Met Ala Ala Val Cys Asp Ile Val Asn His Tyr Ile Glu Thr Ser  
                   20                  25                  30

Thr Val Asn Phe Arg Thr Glu Pro Gln Thr Pro Gln Glu Trp Ile Asp  
                   35                  40                  45

Asp Leu Glu Arg Leu Gln Asp Arg Tyr Pro Trp Leu Val Ala Glu Val  
                   50                  55                  60

Glu Gly Val Val Ala Gly Ile Ala Tyr Ala Gly Pro Trp Lys Ala Arg  
   65                  70                  75                  80

Asn Ala Tyr Asp Trp Thr Val Glu Ser Thr Val Tyr Val Ser His Arg  
                   85                  90                  95

His Gln Arg Leu Gly Leu Gly Ser Thr Leu Tyr Thr His Leu Leu Lys  
                   100                  105                  110

Ser Met Glu Ala Gln Gly Phe Lys Ser Val Val Ala Val Ile Gly Leu  
                   115                  120                  125

Pro Asn Asp Pro Ser Val Arg Leu His Glu Ala Leu Gly Tyr Thr Ala  
                   130                  135                  140

Arg Gly Thr Leu Arg Ala Ala Gly Tyr Lys His Gly Gly Trp His Asp  
   145                  150                  155                  160

Val Gly Phe Trp Gln Arg Asp Phe Glu Leu Pro Ala Pro Pro Arg Pro  
                   165                  170                  175

Val Arg Pro Val Thr Gln Ile  
                   180

<210> 7

<211> 2013

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2010)

<223> acetolactate synthase

<400> 7

atg gcg gcg gca aca aca aca aca aca tct tct tcg atc tcc ttc 48

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ala | Ala | Ala | Thr | Thr | Thr | Thr | Thr | Thr | Ser | Ser | Ser | Ile | Ser | Phe |     |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |
| tcc | acc | aaa | cca | tct | cct | tcc | tcc | tcc | aaa | tca | cca | tta | cca | atc | tcc | 96  |
| Ser | Thr | Lys | Pro | Ser | Pro | Ser | Ser | Ser | Lys | Ser | Pro | Leu | Pro | Ile | Ser |     |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |     |
| aga | ttc | tcc | ctc | cca | ttc | tcc | cta | aac | ccc | aac | aaa | tca | tcc | tcc | tcc | 144 |
| Arg | Phe | Ser | Leu | Pro | Phe | Ser | Leu | Asn | Pro | Asn | Lys | Ser | Ser | Ser | Ser |     |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |     |
| tcc | cgc | cgc | cgc | ggc | atc | aaa | tcc | agc | tct | ccc | tcc | tcc | atc | tcc | gcc | 192 |
| Ser | Arg | Arg | Arg | Gly | Ile | Lys | Ser | Ser | Ser | Pro | Ser | Ser | Ile | Ser | Ala |     |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |     |
| gtg | ctc | aac | aca | acc | acc | aat | gtc | aca | acc | act | ccc | tct | cca | acc | aaa | 240 |
| Val | Leu | Asn | Thr | Thr | Thr | Asn | Val | Thr | Thr | Thr | Pro | Ser | Pro | Thr | Lys |     |
|     | 65  |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     |     |     | 80  |     |
| cct | acc | aaa | ccc | gaa | aca | ttc | atc | tcc | cga | ttc | gct | cca | gat | caa | ccc | 288 |
| Pro | Thr | Lys | Pro | Glu | Thr | Phe | Ile | Ser | Arg | Phe | Ala | Pro | Asp | Gln | Pro |     |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     | 90  |     |     |     |     |     | 95  |     |     |
| cgc | aaa | ggc | gct | gat | atc | ctc | gtc | gaa | gct | tta | gaa | cgt | caa | ggc | gta | 336 |
| Arg | Lys | Gly | Ala | Asp | Ile | Leu | Val | Glu | Ala | Leu | Glu | Arg | Gln | Gly | Val |     |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |     |
| gaa | acc | gta | ttc | gct | tac | cct | gga | ggc | gca | tca | atg | gag | att | cac | caa | 384 |
| Glu | Thr | Val | Phe | Ala | Tyr | Pro | Gly | Gly | Ala | Ser | Met | Glu | Ile | His | Gln |     |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |     |
| gcc | tta | acc | cgc | tct | tcc | tca | atc | cgt | aac | gtc | ctt | cct | cgt | cac | gaa | 432 |
| Ala | Leu | Thr | Arg | Ser | Ser | Ser | Ile | Arg | Asn | Val | Leu | Pro | Arg | His | Glu |     |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |
| caa | gga | ggc | gta | ttc | gca | gca | gaa | gga | tac | gct | cga | tcc | tca | ggc | aaa | 480 |
| Gln | Gly | Gly | Val | Phe | Ala | Ala | Glu | Gly | Tyr | Ala | Arg | Ser | Ser | Gly | Lys |     |
|     | 145 |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     |     | 160 |     |
| cca | ggc | atc | tgt | ata | gcc | act | tca | ggc | ccc | gga | gct | aca | aat | ctc | gtt | 528 |
| Pro | Gly | Ile | Cys | Ile | Ala | Thr | Ser | Gly | Pro | Gly | Ala | Thr | Asn | Leu | Val |     |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     | 175 |     |     |
| agc | gga | tta | gcc | gat | gcg | ttg | tta | gat | agt | ggt | cct | ctt | gta | gca | atc | 576 |
| Ser | Gly | Leu | Ala | Asp | Ala | Leu | Leu | Asp | Ser | Val | Pro | Leu | Val | Ala | Ile |     |
|     |     | 180 |     |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |     |
| aca | gga | caa | gtc | cct | cgt | cgt | atg | att | ggc | aca | gat | gcg | ttt | caa | gag | 624 |
| Thr | Gly | Gln | Val | Pro | Arg | Arg | Met | Ile | Gly | Thr | Asp | Ala | Phe | Gln | Glu |     |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     | 205 |     |     |     |     |     |
| act | ccg | att | gtt | gag | gta | acg | cgt | tcg | att | acg | aag | cat | aac | tat | ctt | 672 |
| Thr | Pro | Ile | Val | Glu | Val | Thr | Arg | Ser | Ile | Thr | Lys | His | Asn | Tyr | Leu |     |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |     |
| gtg | atg | gat | gtt | gaa | gat | atc | cct | agg | att | att | gag | gaa | gct | ttc | ttt | 720 |
| Val | Met | Asp | Val | Glu | Asp | Ile | Pro | Arg | Ile | Ile | Glu | Glu | Ala | Phe | Phe |     |
|     | 225 |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |     |     |
| tta | gct | act | tct | ggc | aga | cct | gga | cct | gtt | ttg | gtt | gat | gtt | cct | aaa | 768 |
| Leu | Ala | Thr | Ser | Gly | Arg | Pro | Gly | Pro | Val | Leu | Val | Asp | Val | Pro | Lys |     |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     | 250 |     |     |     |     |     | 255 |     |     |
| gat | att | caa | caa | cag | ctt | gcg | att | cct | aat | tgg | gaa | cag | gct | atg | aga | 816 |
| Asp | Ile | Gln | Gln | Gln | Leu | Ala | Ile | Pro | Asn | Trp | Glu | Gln | Ala | Met | Arg |     |
|     |     | 260 |     |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |     |

|                                                                 |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|
| tta cct ggt tat atg tct agg atg cct aaa cct ccg gaa gat tct cat | 864  |
| Leu Pro Gly Tyr Met Ser Arg Met Pro Lys Pro Pro Glu Asp Ser His |      |
| 275 280 285                                                     |      |
| ttg gag cag att gtt agg ttg att tct gag tct aag aag cct gtg ttg | 912  |
| Leu Glu Gln Ile Val Arg Leu Ile Ser Glu Ser Lys Lys Pro Val Leu |      |
| 290 295 300                                                     |      |
| tat gtt ggt ggt ggt tgt ttg aat tct agc gat gaa ttg ggt agg ttt | 960  |
| Tyr Val Gly Gly Gly Cys Leu Asn Ser Ser Asp Glu Leu Gly Arg Phe |      |
| 305 310 315 320                                                 |      |
| gtt gag ctt acg ggg atc cct gtt gcg agt acg ttg atg ggg ctg gga | 1008 |
| Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly |      |
| 325 330 335                                                     |      |
| tct tat cct tgt gat gat gag ttg tcg tta cat atg ctt gga atg cat | 1056 |
| Ser Tyr Pro Cys Asp Asp Glu Leu Ser Leu His Met Leu Gly Met His |      |
| 340 345 350                                                     |      |
| ggg act gtg tat gca aat tac gct gtg gag cat agt gat ttg ttg ttg | 1104 |
| Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Glu His Ser Asp Leu Leu Leu |      |
| 355 360 365                                                     |      |
| gcg ttt ggg gta agg ttt gat gat cgt gtc acg ggt aag ctt gag gct | 1152 |
| Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala |      |
| 370 375 380                                                     |      |
| ttt gct agt agg gct aag att gtt cat att gat att gac tcg gct gag | 1200 |
| Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu |      |
| 385 390 395 400                                                 |      |
| att ggg aag aat aag act cct cat gtg tct gtg tgt ggt gat gtt aag | 1248 |
| Ile Gly Lys Asn Lys Thr Pro His Val Ser Val Cys Gly Asp Val Lys |      |
| 405 410 415                                                     |      |
| ctg gct ttg caa ggg atg aat aag gtt ctt gag aac cga gcg gag gag | 1296 |
| Leu Ala Leu Gln Gly Met Asn Lys Val Leu Glu Asn Arg Ala Glu Glu |      |
| 420 425 430                                                     |      |
| ctt aag ctt gat ttt gga gtt tgg agg aat gag ttg aac gta cag aaa | 1344 |
| Leu Lys Leu Asp Phe Gly Val Trp Arg Asn Glu Leu Asn Val Gln Lys |      |
| 435 440 445                                                     |      |
| cag aag ttt ccg ttg agc ttt aag acg ttt ggg gaa gct att cct cca | 1392 |
| Gln Lys Phe Pro Leu Ser Phe Lys Thr Phe Gly Glu Ala Ile Pro Pro |      |
| 450 455 460                                                     |      |
| cag tat gcg att aag gtc ctt gat gag ttg act gat gga aaa gcc ata | 1440 |
| Gln Tyr Ala Ile Lys Val Leu Asp Glu Leu Thr Asp Gly Lys Ala Ile |      |
| 465 470 475 480                                                 |      |
| ata agt act ggt gtc ggg caa cat caa atg tgg gcg gcg cag ttc tac | 1488 |
| Ile Ser Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Tyr |      |
| 485 490 495                                                     |      |
| aat tac aag aaa cca agg cag tgg cta tca tca gga ggc ctt gga gct | 1536 |
| Asn Tyr Lys Lys Pro Arg Gln Trp Leu Ser Ser Gly Gly Leu Gly Ala |      |
| 500 505 510                                                     |      |
| atg gga ttt gga ctt cct gct gcg att gga gcg tct gtt gct aac cct | 1584 |
| Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ser Val Ala Asn Pro |      |
| 515 520 525                                                     |      |
| gat gcg ata gtt gtg gat att gac gga gat gga agc ttt ata atg aat | 1632 |
| Asp Ala Ile Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn |      |
| 530 535 540                                                     |      |

```

gtg caa gag cta gcc act att cgt gta gag aat ctt cca gtg aag gta 1680
Val Gln Glu Leu Ala Thr Ile Arg Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Val
545                    550                    555                    560

ctt tta tta aac aac cag cat ctt ggc atg gtt atg caa tgg gaa gat 1728
Leu Leu Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Met Gln Trp Glu Asp
565                    570                    575

cgg ttc tac aaa gct aac cga gct cac aca ttt ctc ggg gat ccg gct 1776
Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Phe Leu Gly Asp Pro Ala
580                    585                    590

cag gag gac gag ata ttc ccg aac atg ttg ctg ttt gca gca gct tgc 1824
Gln Glu Asp Glu Ile Phe Pro Asn Met Leu Leu Phe Ala Ala Ala Cys
595                    600                    605

ggg att cca gcg gcg agg gtg aca aag aaa gca gat ctc cga gaa gct 1872
Gly Ile Pro Ala Ala Arg Val Thr Lys Lys Ala Asp Leu Arg Glu Ala
610                    615                    620

att cag aca atg ctg gat aca cca gga cct tac ctg ttg gat gtg att 1920
Ile Gln Thr Met Leu Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile
625                    630                    635                    640

tgt ccg cac caa gaa cat gtg ttg ccg atg atc ccg aat ggt ggc act 1968
Cys Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro Asn Gly Gly Thr
645                    650                    655

ttc aac gat gtc ata acg gaa gga gat ggc cgg att aaa tac tga 2013
Phe Asn Asp Val Ile Thr Glu Gly Asp Gly Arg Ile Lys Tyr
660                    665                    670

```

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 670

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 8

```

Met Ala Ala Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ser Ser Ser Ile Ser Phe
 1                    5                    10                    15

Ser Thr Lys Pro Ser Pro Ser Ser Ser Lys Ser Pro Leu Pro Ile Ser
20                    25                    30

Arg Phe Ser Leu Pro Phe Ser Leu Asn Pro Asn Lys Ser Ser Ser Ser
35                    40                    45

Ser Arg Arg Arg Gly Ile Lys Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ile Ser Ala
50                    55                    60

Val Leu Asn Thr Thr Thr Asn Val Thr Thr Thr Pro Ser Pro Thr Lys
65                    70                    75                    80

Pro Thr Lys Pro Glu Thr Phe Ile Ser Arg Phe Ala Pro Asp Gln Pro
85                    90                    95

Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Gln Gly Val
100                    105                    110

Glu Thr Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala Ser Met Glu Ile His Gln
115                    120                    125

Ala Leu Thr Arg Ser Ser Ser Ile Arg Asn Val Leu Pro Arg His Glu
130                    135                    140

Gln Gly Gly Val Phe Ala Ala Glu Gly Tyr Ala Arg Ser Ser Gly Lys
145                    150                    155                    160

```

|                 |                                                 |                             |
|-----------------|-------------------------------------------------|-----------------------------|
| Pro Gly Ile Cys | Ile Ala Thr Ser Gly                             | Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val |
| 165             | 170                                             | 175                         |
| Ser Gly Leu Ala | Asp Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Leu Val Ala Ile |                             |
| 180             | 185                                             | 190                         |
| Thr Gly Gln Val | Pro Arg Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu |                             |
| 195             | 200                                             | 205                         |
| Thr Pro Ile Val | Glu Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu |                             |
| 210             | 215                                             | 220                         |
| Val Met Asp Val | Glu Asp Ile Pro Arg Ile Ile Glu Glu Ala Phe Phe |                             |
| 225             | 230                                             | 235                         |
| Leu Ala Thr Ser | Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Val Asp Val Pro Lys |                             |
| 245             | 250                                             | 255                         |
| Asp Ile Gln Gln | Gln Leu Ala Ile Pro Asn Trp Glu Gln Ala Met Arg |                             |
| 260             | 265                                             | 270                         |
| Leu Pro Gly Tyr | Met Ser Arg Met Pro Lys Pro Pro Glu Asp Ser His |                             |
| 275             | 280                                             | 285                         |
| Leu Glu Gln Ile | Val Arg Leu Ile Ser Glu Ser Lys Lys Pro Val Leu |                             |
| 290             | 295                                             | 300                         |
| Tyr Val Gly Gly | Gly Cys Leu Asn Ser Ser Asp Glu Leu Gly Arg Phe |                             |
| 305             | 310                                             | 315                         |
| Val Glu Leu Thr | Gly Ile Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly Leu Gly |                             |
| 325             | 330                                             | 335                         |
| Ser Tyr Pro Cys | Asp Asp Glu Leu Ser Leu His Met Leu Gly Met His |                             |
| 340             | 345                                             | 350                         |
| Gly Thr Val Tyr | Ala Asn Tyr Ala Val Glu His Ser Asp Leu Leu Leu |                             |
| 355             | 360                                             | 365                         |
| Ala Phe Gly Val | Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala |                             |
| 370             | 375                                             | 380                         |
| Phe Ala Ser Arg | Ala Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu |                             |
| 385             | 390                                             | 395                         |
| Ile Gly Lys Asn | Lys Thr Pro His Val Ser Val Cys Gly Asp Val Lys |                             |
| 405             | 410                                             | 415                         |
| Leu Ala Leu Gln | Gly Met Asn Lys Val Leu Glu Asn Arg Ala Glu Glu |                             |
| 420             | 425                                             | 430                         |
| Leu Lys Leu Asp | Phe Gly Val Trp Arg Asn Glu Leu Asn Val Gln Lys |                             |
| 435             | 440                                             | 445                         |
| Gln Lys Phe Pro | Leu Ser Phe Lys Thr Phe Gly Glu Ala Ile Pro Pro |                             |
| 450             | 455                                             | 460                         |
| Gln Tyr Ala Ile | Lys Val Leu Asp Glu Leu Thr Asp Gly Lys Ala Ile |                             |
| 465             | 470                                             | 475                         |
| Ile Ser Thr Gly | Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Phe Tyr |                             |
| 485             | 490                                             | 495                         |
| Asn Tyr Lys Lys | Pro Arg Gln Trp Leu Ser Ser Gly Gly Leu Gly Ala |                             |
| 500             | 505                                             | 510                         |
| Met Gly Phe Gly | Leu Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ser Val Ala Asn Pro |                             |
| 515             | 520                                             | 525                         |
| Asp Ala Ile Val | Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn |                             |
| 530             | 535                                             | 540                         |

Val Gln Glu Leu Ala Thr Ile Arg Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Val  
 545 550 555 560  
 Leu Leu Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Met Gln Trp Glu Asp  
 565 570 575  
 Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Phe Leu Gly Asp Pro Ala  
 580 585 590  
 Gln Glu Asp Glu Ile Phe Pro Asn Met Leu Leu Phe Ala Ala Ala Cys  
 595 600 605  
 Gly Ile Pro Ala Ala Arg Val Thr Lys Lys Ala Asp Leu Arg Glu Ala  
 610 615 620  
 Ile Gln Thr Met Leu Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile  
 625 630 635 640  
 Cys Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro Asn Gly Gly Thr  
 645 650 655  
 Phe Asn Asp Val Ile Thr Glu Gly Asp Gly Arg Ile Lys Tyr  
 660 665 670

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
 oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 9

gtcgacgaat tcgagagaca gagagacgg

29

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
 oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 10

gtcgacggta ccgattcaag cttcactgc

29

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
 oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 11

gagaattcga ttcaagcttc actgc

25

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
 oligonucleotide primer

<400> 12  
ccatgggaga gacagagaga cg 22

<210> 13  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 13  
acggatccga gagacagaga gacggagaca aaa 33

<210> 14  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 14  
gcggatccaa cactcttaac accaaatcaa ca 32

<210> 15  
<211> 44  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 15  
gtcgcacggat ccggttgatc agaagaagaa gaagaagatg aact 44

<210> 16  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 16  
gtcgactcta gattcattat ttcgattttg atttcgtgac c 41

<210> 17  
<211> 50  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 17  
aagtcgacgg atccataacc aaaagaactc tgatcatgta cgtacccatt 50

<210> 18  
<211> 50  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 18  
agacgtcgac tctagatgaa atcgaaattc agagttttga tagtgagagc . 50

<210> 19  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 19  
ccaaaccatg gtaagtttgt ctaaagctta 30

<210> 20  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 20  
cggatccttt tgtgtttcgt cttctctcac g 31

<210> 21  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 21  
gtctagaggc aaaccaccga gtggt 25

<210> 22  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 22  
cggtacctgt ttccagaaaa ttttgattca g 31

<210> 23  
<211> 7554  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: binary plant  
expression vector

<400> 23  
ttccatggac atacaaatgg acgaacggat aaaccttttc acgccctttt aaatatccga 60

|             |             |             |             |            |             |      |
|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|------|
| ttatttcta   | aaacgctctt  | ttctcttagg  | tttaccgcgc  | aatatatcct | gtcaaacact  | 120  |
| gatagtttaa  | actgaaggcg  | ggaaacgaca  | atcagatcta  | gtaggaaaca | gctatgacca  | 180  |
| tgattacgcc  | aagcttgcag  | gcctgcaggt  | cgactctaga  | ctagtggatc | cgatatcgcc  | 240  |
| cgggctcgag  | gtaccgagct  | cgaattcact  | ggcgcgcgtt  | ttacaacgac | tcagagcttg  | 300  |
| acaggaggcc  | cgatctagta  | acatagatga  | caccgcgcgc  | gataatttat | cctagtttgc  | 360  |
| gcgctatatt  | ttgttttcta  | tcgcggtatta | aatgtataat  | tgcgggactc | taatcataaa  | 420  |
| aacccatctc  | ataaataacg  | tcatgcatta  | catgttaatt  | attacatgct | taacgtaatt  | 480  |
| caacagaaat  | tatatgataa  | tcacgcgaag  | accggcaaca  | ggattcaatc | ttaagaaact  | 540  |
| ttattgccaa  | atgtttgaac  | gatcggggat  | catccgggtc  | tgtggcgggg | actccacgaa  | 600  |
| aatatccgaa  | cgcagcaaga  | tctaagcttg  | ggccccgctc  | agaagaactc | gtcaagaagg  | 660  |
| cgatagaagg  | cgatgcgctg  | cgaatcgggg  | gcggcgatac  | cgtaaagcac | gaggaagcgg  | 720  |
| tcagcccatt  | cgccgccaag  | ctcttcagca  | atatcacggg  | tagccaacgc | tatgtcctga  | 780  |
| tagcggctcg  | ccacaccag   | ccggccacag  | tcgatgaatc  | cagaaaagcg | gccattttcc  | 840  |
| accatgatat  | tcggcaagca  | ggcatcgcca  | tgggtcacga  | cgagatcctc | gccgtcgggc  | 900  |
| atgcgcgcct  | tgagcctggc  | gaacagtctg  | gctggcgcg   | gcccctgatg | ctcttcgtcc  | 960  |
| agatcatcct  | gatcgacaag  | accggcttcc  | atccgagtac  | gtgctcgctc | gatgcgatgt  | 1020 |
| ttcgcttggt  | ggtcgaatgg  | gcaggtagcc  | ggatcaagcg  | tatgcagccg | ccgcattgca  | 1080 |
| tcagccatga  | tggatacttt  | ctcggcagga  | gcaaggtagg  | atgacaggag | atcctgcccc  | 1140 |
| ggcacttcgc  | ccaatagcag  | ccagtccctt  | cccgttcag   | tgacaacgtc | gagcacagct  | 1200 |
| gcgcaaggaa  | cgcccgctcg  | ggccagccac  | gatagccgcg  | ctgcctcgtc | ctgcagttca  | 1260 |
| ttcagggcac  | cggacaggtc  | ggtcttgaca  | aaaagaaccg  | ggcgcccctg | cgctgacagc  | 1320 |
| cggaacacgg  | cggcatcaga  | gcagccgatt  | gtctgtttgt  | cccagtcata | gccgaatagc  | 1380 |
| ctctccaccc  | aagcggcccg  | agaacctgcy  | tgcaatccat  | cttggtcaat | catgcgaaac  | 1440 |
| gatccagatc  | cgggtgcagat | tatttggtat  | gagagtgaat  | atgagactct | aattggatac  | 1500 |
| cgaggggaat  | ttatggaacg  | tcagtggagc  | atctttgaca  | agaaatattt | gctagctgat  | 1560 |
| agtgacctta  | ggcgactttt  | gaacgcgcaa  | taatggtttc  | tgacgtatgt | gcttagctca  | 1620 |
| ttaaactcca  | gaaaccgcgc  | gctgagtggc  | tccttcaacg  | ttgcggttct | gtcagttcca  | 1680 |
| aacgtaaaac  | ggcttgctcc  | gcgtcatcgg  | cgggggtcat  | aacgtgactc | ccttaattct  | 1740 |
| ccgctcatga  | tcagattgtc  | gtttcccgc   | ttcagtttaa  | actatcagtg | tttgacagga  | 1800 |
| tcctgcttgg  | taataattgt  | cattagattg  | tttttatgca  | tagatgcact | cgaaatcagc  | 1860 |
| caattttaga  | caagtatcaa  | acggatgtta  | attcagtaca  | ttaaagacgt | ccgcaatgtg  | 1920 |
| ttattaagtt  | gtctaagcgt  | caatttgttt  | acaccacaat  | atatectgcc | accagccagc  | 1980 |
| caacagctcc  | ccgaccggca  | gctcggcaca  | aatcaccac   | gcgttaccac | cacgcccggc  | 2040 |
| ggccgcagtg  | tggtgaccgt  | gttcgcccgc  | attgccgagt  | tcgagcggtc | cctaatactc  | 2100 |
| gaccgcaccc  | ggagcgggcg  | cgaggccgcc  | aaggcccag   | gcgtgaagtt | tggccccgc   | 2160 |
| cctaccctca  | ccccggcaca  | gatcgcgcac  | gcccgcgagc  | tgatcgacca | ggaaggccgc  | 2220 |
| accgtgaaag  | aggcggctgc  | actgcttggc  | gtgcatcgct  | cgaccctgta | ccgcgcactt  | 2280 |
| gagcgcagcg  | aggaagtgc   | gcccaccgag  | gccaggcggc  | gcggtgcctt | ccgtgaggac  | 2340 |
| gcattgaccg  | aggccgacgc  | cctggcggcc  | gccgagaatg  | aacgccaaga | ggaacaagca  | 2400 |
| tgaaccgca   | ccaggacggc  | caggacgaac  | cgtttttcat  | taccgaagag | atcgaggcgg  | 2460 |
| agatgatcgc  | ggccgggtac  | gtgttcgagc  | cgcccgcgca  | cgtctcaacc | gtgcggctgc  | 2520 |
| atgaaatcct  | ggccggtttg  | tctgatgcca  | agctggcggc  | ctggccggcc | agcttgggccg | 2580 |
| ctgaagaaac  | cgagcgccgc  | cgtctaaaaa  | ggtgatgtgt  | atttgagtaa | aacagcttgc  | 2640 |
| gtcatgcggt  | cgctgcgtat  | atgatgcgat  | gagtaaataa  | acaaatacgc | aaggggaacg  | 2700 |
| catgaagggt  | atcgctgtac  | ttaaccagaa  | aggcgggtca  | ggcaagacga | ccatcgcaac  | 2760 |
| ccatctagcc  | cgcccccctgc | aactcgccgg  | ggccgatgtt  | ctgttagtcg | attccgatcc  | 2820 |
| ccagggcagt  | gcccgcgatt  | gggcggccgt  | gcgggaagat  | caaccgctaa | ccgttgctcg  | 2880 |
| catcgaccgc  | ccgacgattg  | accgcgacgt  | gaaggccatc  | ggccggcgcg | acttcgtagt  | 2940 |
| gatcgacgga  | gcgccccagg  | cggcggactt  | ggctgtgtcc  | gcgatcaagg | cagccgactt  | 3000 |
| cgtgctgatt  | ccggtgcagc  | caagccctta  | cgacatatgg  | gccaccgccc | acctggtgga  | 3060 |
| gctgggttaag | cagcgcattg  | aggtcacgga  | tggaaaggcta | caagcggcct | ttgtcgtgtc  | 3120 |
| gcgggcgatc  | aaaggcacgc  | gcacggcgcg  | tgaggttgcc  | gaggcgctgg | ccgggtacga  | 3180 |
| gctgccatt   | cttgagtccc  | gtatcacgca  | gcgcgtgagc  | taccaggcca | ctgccgccgc  | 3240 |
| cggcacaacc  | gttcttgaat  | cagaaccoga  | gggcgacgct  | gcccgcgagg | tccaggcgct  | 3300 |
| ggccgctgaa  | attaaatcaa  | aactcatttg  | agttaatgag  | gtaaagagaa | aatgagcaaa  | 3360 |
| agcacaacaa  | cgctaagtgc  | cggccgctccg | agcgcacgca  | gcagcaaggc | tgcaacgttg  | 3420 |
| gccagcctgg  | cagacacgcc  | agccatgaag  | cgggtcaact  | ttcagttgcc | ggcggaggat  | 3480 |

|             |             |             |             |             |             |      |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| cacaccaagc  | tgaagatgta  | cgcggtacgc  | caaggcaaga  | ccattaccga  | gctgctatct  | 3540 |
| gaatacatcg  | cgcagctacc  | agagtaaattg | agcaaataaa  | taaatgagta  | gatgaatttt  | 3600 |
| agcgggctaaa | ggaggcggca  | tggaaaatca  | agaacaacca  | ggcaccgacg  | ccgtggaatg  | 3660 |
| ccccatgtgt  | ggaggaacgg  | gcgggttgcc  | aggcgtaagc  | ggctgggttg  | tctgccggcc  | 3720 |
| ctgcaatggc  | actggaaccc  | ccaagcccga  | ggaatcggcg  | tgagcggctg  | caaaccatcc  | 3780 |
| ggccccgtac  | aaatcggcgc  | ggcgctgggt  | gatgacctgg  | tggagaagtt  | gaaggccgcg  | 3840 |
| caggccgccc  | agcggcaacg  | catcgaggca  | gaagcacgcc  | ccggtgaatc  | gtggcaagcg  | 3900 |
| gccgctgate  | gaatccgcaa  | agaatcccgg  | caaccgcggg  | cagccgggtg  | gccgtcgatt  | 3960 |
| aggaagccgc  | ccaaggcgga  | cgagcaacca  | gatttttttcg | ttccgatgct  | ctatgacgtg  | 4020 |
| ggcaccgcg   | atagtcgcag  | catcatggac  | gtggccgttt  | tccgtctgtc  | gaagcgtgac  | 4080 |
| cgacgagctg  | gcgaggtgat  | ccgctacgag  | cttcacagacg | ggcacgtaga  | ggtttccgca  | 4140 |
| gggcccggccg | gcatggccag  | tgtgtgggat  | tacgacctgg  | tactgatggc  | ggtttcccat  | 4200 |
| ctaaccgaat  | ccatgaaccg  | ataccgggaa  | gggaaggag   | acaagcccgg  | ccgctgttcc  | 4260 |
| cgtccacacg  | ttgcccagct  | actcaagttc  | tgccggcgag  | ccgatggcgg  | aaagcagaaa  | 4320 |
| gacgacctgg  | tagaaacctg  | cattcgggtta | aacaccacgc  | acgttgccat  | gcagcgtacg  | 4380 |
| aagaaggcca  | agaacggccg  | cctggtgacg  | gtatccgagg  | gtgaagcctt  | gattagccgc  | 4440 |
| tacaagatcg  | taaagagcga  | aaccggggcg  | ccggagtaca  | tcgagatcga  | gctagctgat  | 4500 |
| tggatgtacc  | gcgagatcac  | agaaggcaag  | aaccgggacg  | tgctgacggg  | tcaccccgat  | 4560 |
| tactttttga  | tcgatcccg   | catcggccgt  | tttctctacc  | gcctggcacg  | ccgcgccgca  | 4620 |
| ggcaaggcag  | aagccagatg  | gttgttcaag  | acgatctacg  | aacgcagtgg  | cagcgccgga  | 4680 |
| gagttcaaga  | agttctgttt  | caccgtgcgc  | aagctgatcg  | ggtcaaatga  | cctgccggag  | 4740 |
| tacgatttga  | aggaggaggc  | ggggcaggct  | ggcccgatcc  | tagtcatgcg  | ctaccgcaac  | 4800 |
| ctgatcgagg  | gcgaagcatc  | cgccgggttcc | taatgtacgg  | agcagatgct  | agggcaaat   | 4860 |
| gccctagcag  | gggaaaaagg  | tcgaaaagg   | ctctttcctg  | tggatagcac  | gtacattggg  | 4920 |
| aacccaaagc  | cgtacattgg  | gaaccggaac  | ccgtacattg  | ggaacccaaa  | gccgtacatt  | 4980 |
| gggaaccggg  | cacacatgta  | agtgaactgat | ataaaaagaga | aaaaaggcga  | tttttccgcc  | 5040 |
| taaaactctt  | taaaacttat  | taaaactctt  | aaaaccgcgc  | tggcctgtgc  | ataactgtct  | 5100 |
| ggccagcgca  | cagccgaaga  | gctgcaaaaa  | gcgcctaccc  | ttcggctcgt  | gcgctcccta  | 5160 |
| cgccccgccc  | cttcgcgtcg  | gcctatcgcg  | gccgctggcc  | gctcaaaaat  | ggctggccta  | 5220 |
| cggccaggca  | atctaccagg  | gcgcggacaa  | gccgcgccgt  | cgccactcga  | ccgcggcgcc  | 5280 |
| ccacatcaag  | gcaccctgcc  | tcgcgcgttt  | cggtgatgac  | ggtgaaaacc  | tctgacacat  | 5340 |
| gcagctccc   | gagacgggtca | cagcttgtct  | gtaagcggat  | gccgggagca  | gacaagccc   | 5400 |
| tcagggcgcg  | tcagcgggtg  | ttggcgggtg  | tcggggcgca  | gccatgacct  | agtcacgtag  | 5460 |
| cgatagcgga  | gtgtatactg  | gcttaactat  | gcggcatcag  | agcagattgt  | actgagagt   | 5520 |
| caccatatgc  | ggtgtgaaat  | accgcacaga  | tgctgaagga  | gaaaataacc  | catcaggcgc  | 5580 |
| tcttccgctt  | cctcgctcac  | tgactcgctg  | cgctcggtcg  | ttcggctcgc  | gcgagcggta  | 5640 |
| tcagctcact  | caaaggcgg   | aatacgggtta | tccacagaat  | caggggataa  | cgcaggaaag  | 5700 |
| aacatgtgag  | caaaaaggcca | gcaaaaaggcc | aggaaccgta  | aaaaggccgc  | ggtgctggcg  | 5760 |
| tttttccata  | ggctccgccc  | ccctgacgag  | catcacaaaa  | atcgacgctc  | aagtacagagg | 5820 |
| tggcgaaacc  | cgacaggact  | ataaagatac  | caggcgtttc  | cccctggaag  | ctccctcggtg | 5880 |
| cgctctcctg  | ttccgaccct  | gccgcttacc  | ggatacctgt  | ccgcctttct  | cccttcggga  | 5940 |
| agcgtggcgc  | tttctcatag  | ctcacgctgt  | aggtatctca  | gttcgggtgta | ggtcggtcgc  | 6000 |
| tccaagctgg  | gctgtgtgca  | cgaaccccc   | gttcagcccc  | accgctgcgc  | cttatccgg   | 6060 |
| aactatcgtc  | ttgagtccaa  | cccggtaaga  | cacgacttat  | cgccactggc  | agcagccact  | 6120 |
| ggtaacagga  | ttagcagagc  | gaggtatgta  | ggcgggtgta  | cagagttctt  | gaagtgggtg  | 6180 |
| cctaactacg  | gctacactag  | aaggacagta  | tttggtatct  | gcgctctgct  | gaagccagtt  | 6240 |
| accttcggaa  | aaagagttgg  | tagctcttga  | tccggcaaac  | aaaccaccgc  | tggtagcgg   | 6300 |
| ggtttttttg  | tttgcaagca  | gcagattacg  | cgcagaaaaa  | aaggatctca  | agaagatcct  | 6360 |
| ttgatctttt  | ctacggggtc  | tgacgctcag  | tggaaacgaaa | actcacgtta  | agggattttg  | 6420 |
| gtcatgcatg  | atatatctcc  | caatttgtgt  | agggcttatt  | atgcacgctt  | aaaaataata  | 6480 |
| aaagcagact  | tgacctgata  | gtttggctgt  | gagcaattat  | gtgcttagtg  | catctaaccg  | 6540 |
| ttgagttaag  | ccgcgcgcgc  | aagcggcgct  | ggcttgaacg  | aatttctagc  | tagacattat  | 6600 |
| ttgccgacta  | ccttgggtgat | ctcgcccttc  | acgtagtggg  | caaattcttc  | caactgatct  | 6660 |
| gcgcgcgagg  | ccaagcgatc  | ttcttcttgt  | ccaagataag  | cctgtctagc  | ttcaagtatg  | 6720 |
| acgggctgat  | actgggccc   | caggcgctcc  | attgcccag   | cggcagcgac  | atccttcggc  | 6780 |
| gcgattttgc  | cggttactgc  | gctgtaccaa  | atgcccggaca | acgtaagcac  | tacatttcgc  | 6840 |
| tcacgcccag  | cccagtcggg  | cggcgagttc  | catagcggtta | aggtttcatt  | tagcgccctca | 6900 |

```

aatagatcct gttcaggaac cggatcaaag agttcctccg ccgctggacc taccaaggca 6960
acgctatggt ctcttgcttt tgtcagcaag atagccagat caatgtcgat cgtggctggc 7020
tcgaagatac ctgcaagaat gtcattgcgc tgccattctc caaattgcag ttcgcgctta 7080
gctggataac gccacggaat gatgtcgtcg tgcacaacaa tggtgacttc tacagcgcgg 7140
agaatctcgc tctctccagg ggaagccgaa gtttccaaaa ggtcgttgat caaagctcgc 7200
cgcgttggtt catcaagcct tacggtcacc gtaaccagca aatcaatctc actgtgtggc 7260
ttcaggccgc catccactgc ggagccgtac aaatgtacgg ccagcaacgt cggttcgaga 7320
tggcgctcga tgacgccaac tacctctgat agttgagtcg atacttcggc gatcaccgct 7380
tcccccatga tgtttaactt tgttttaggg cgaactgcct gctgcgtaac atcgttgctg 7440
ctccataaca tcaaaccatcg acccagggcg taacgcgctt gctgcttgga tgcccgaggc 7500
atagactgta ccccaaaaaa acagtcataa caagccatga aaaccgccac tgcg 7554

```

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 8327

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: binary  
plant expression vector

&lt;400&gt; 24

```

ttccatggac atacaaatgg acgaacggat aaaccttttc acgccctttt aaatatccga 60
ttattctaataaacgctctt ttctcttagg ttaccgcgc aatataatcct gtcaaacact 120
gatagtttaa actgaaggcg ggaaacgaca atcagatcta gtaggaaaca gctatgacca 180
tgattacgcc aagcttgcat gccgatcccc cctgcagata gactatacta tgttttagcc 240
tgctgctgg ctactacta tgttatgtta tgttgtaaaa taaacacctg ctaaggata 300
tctatctata ttttagcatg gctttctcaa taaattgtct ttccttatcg tttactatct 360
tatacctaataatgaaataa taatatcaca tatgaggaac ggggcagggt taggcatata 420
tatacagatg tagggcggag tgggggggta cggtcgactc tagactagt gatccnnmtc 480
aagaaggcga tagaaggcga tgcgctgcga atcgggagcg gcgataccgt aaagcacgag 540
gaagcgggtca gcccatcgc cgccaagctc ttacagcaata tcacgggtag ccaacgctat 600
gtcctgatag cggtcgcgca caccagccg gccacagtcg atgaatccag aaaagcggcc 660
attttccacc atgatattcg gcaagcaggc atcgccatgg gtcacgacga gatcctcgcc 720
gtcgggcatg cgcgccttga gcctggcgaa cagttcggct ggcgcgagcc cctgatgctc 780
ttcgtccaga tcactctgat cgacaagacc ggcttccatc cgagtacgtg ctgcgtcgat 840
gcatgttttc gcttggtggt cgaatgggca ggtagccgga tcaagcgtat gcagccgccg 900
cattgcatca gccatgatgg atactttctc ggcaggagca aggtgagatg acaggagatc 960
ctgccccggc acttcgcca atagcagcca gtcccttccc gcttcagtga caacgtcgag 1020
cacagctgcg caaggaacgc ccgtcgtggc cagccacgat agccgcgctg cctcgtcctg 1080
cagttcattc agggcacccg acaggtcggc cttgacaaaa agaaccgggc gccctgcgc 1140
tgacagccgg aacacggcg catcagagca gccgattgtc tgttggtgcc agtcatagcc 1200
gaatagcttc tccaccaag cggccggaga acctgcgtgc aatccatctt gttcaatcat 1260
nnnagatccg atatcgccc ggctcgaggt accgagctcg aattcactgg ccgtcgtttt 1320
acaacgactc agccagcttg acaggaggcc cgatctagta acatagatga caccgcgcgc 1380
gataatttat cctagtttgc gcgctatatt ttgttttcta tcgcgtatta aatgtataat 1440
tgcgggactc taatcataaa aacctatctc ataaataacg tcatgcatta catgttaatt 1500
attacatgct taacgtaatt caacagaaat tatatgataa tcatcgcaag accggcaaca 1560
ggattcaatc ttaagaaact ttattgccaa atgtttgaac gatcggggat catccgggtc 1620
tgtggcgagg actccacgaa aatatccgaa cgcagcaaga tcggtcgatc gactcagatc 1680
tgggtaactg gcctaactgg ccttgaggga gctggcaact caaaatccct ttgccaaaaa 1740
ccaacatcat gccatccacc atgcttgat ccagccgcgc gcaatgtacc ccgcgctgtg 1800
tatcccaaag cctcatgcaa cctaacagat ggatcgtttg gaaggcctat aacagcaacc 1860
acagacttaa aaccttgccg ctccatagac ttaagcaaat gtgtgtacaa ttagatcct 1920
aggcccaacc tttgatgcct atgtgacacg taaacagtag tctcaactgt ccaatcgtaa 1980
gcgttcctag ccttccaggg ccagcgtaa gcaataccag ccacaacacc ctcaacctca 2040
gcaaccaacc aagggtatct atcttgcaac ctctctaggt catcaatcca ctcttggtgt 2100
gtttgtggct ctgtcctaaa gttcactgta gacgtctcaa tgtaatggtt aacgatgtca 2160
caaaccgcgg ccatatcggc tgctgtagct ggccaatct caactggtct cctctccgga 2220

```

|             |             |             |             |            |             |      |
|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|------|
| gacatgtcga  | gattatattgg | attgagagtg  | aatatgagac  | tctaattgga | taccgagggg  | 2280 |
| aatttatgga  | acgtcagtg   | agcatttttg  | acaagaaata  | tttgctagct | gatagtgacc  | 2340 |
| ttaggcgact  | tttgaacg    | caataatgg   | ttctgacgta  | tgtgcttagc | tcattaaact  | 2400 |
| ccagaaaccc  | gcggtcag    | ggctccttca  | acgttgcggt  | tctgtcagtt | ccaaacgtaa  | 2460 |
| aacggcttgt  | cccgcgtcat  | cggcgggggt  | cataacgtga  | ctcccttaat | tctccgctca  | 2520 |
| tgatcagatt  | gtcgtttccc  | gccttcagtt  | taaaactatca | gtgtttgaca | ggatcctgct  | 2580 |
| tggtataaat  | tgtcattaga  | ttgtttttat  | gcatagatgc  | actcgaaatc | agccaatttt  | 2640 |
| agacaagtat  | caaacggatg  | ttaattcagt  | acattaaaga  | cgtccgcaat | gtgttattaa  | 2700 |
| gttgtctaag  | cgtcaatttg  | tttacaccac  | aatatatacct | gccaccagcc | agccaacagc  | 2760 |
| tccccgacg   | gcagctcggc  | acaaaatcac  | cacgcgttac  | caccacgcg  | gccggccgca  | 2820 |
| tggtgttgac  | cgtgttcgcc  | ggcattggcg  | agttcgagcg  | ttccctaata | atcgaccgca  | 2880 |
| ccgggagcgg  | gcgcgaggcc  | gccaaaggccc | gaggcgtgaa  | gtttggcccc | cgccctaccc  | 2940 |
| tcaccccggc  | acagatcgcg  | cacgcccgcg  | agctgatcga  | ccaggaaggc | cgcaccgtga  | 3000 |
| aagaggcggc  | tgcactgctt  | ggcgtgcac   | gctcgaccct  | gtaccgcgca | cttgagcgca  | 3060 |
| gcgaggaagt  | gacgcccacc  | gaggccaggc  | ggcgcggtgc  | cttccgtgag | gacgcattga  | 3120 |
| ccgaggccga  | cgccttgccg  | gccgcccaga  | atgaacgcca  | agaggaacaa | gcatgaaacc  | 3180 |
| gcaccaggac  | ggccaggacg  | aaccgttttt  | cattaccgaa  | gagatcgagg | cggagatgat  | 3240 |
| cgcggccggg  | tacgtgttcg  | agccgcccgc  | gcacgtctca  | accgtgcggc | tgcatgaaat  | 3300 |
| cctggccggt  | ttgtctgatg  | ccaagctggc  | ggcctggccg  | gccagcttgg | ccgctgaaga  | 3360 |
| aaccgagcgc  | cgcggtctaa  | aaaggtgatg  | tgtatttgag  | taaaacagct | tgcgctcatgc | 3420 |
| ggtcgctgcg  | tatatgatgc  | gatgagtaaa  | taaacaata   | cgcaagggga | acgcatgaag  | 3480 |
| gttatcgctg  | tacttaacca  | gaaaggcggg  | tcaggcaaga  | cgaccatcgc | aacccatcta  | 3540 |
| gcccgcgccc  | tgcaactcgc  | cggggccgat  | gttctgttag  | tcgattccga | tccccagggc  | 3600 |
| agtgcgcgcg  | attgggcggc  | cgtgcgggaa  | gatcaaccgc  | taaccgttgt | cggcatcgac  | 3660 |
| cgcccagcga  | ttgaccgcga  | cgtgaaggcc  | atcggcgcgc  | gcgacttcgt | agtgatcgac  | 3720 |
| ggagcgcccc  | aggcggcgga  | cttggtctgt  | tccgcgatca  | aggcagccga | cttcgtgctg  | 3780 |
| attccggtgc  | agccaagccc  | ttacgacata  | tgggccaccg  | ccgacctggt | ggagctggtt  | 3840 |
| aagcagcgca  | ttgaggtcac  | ggatggaagg  | ctacaagcgg  | cctttgtcgt | gtcgcgggcg  | 3900 |
| atcaaaggca  | cgcgcacgcg  | cggtgaggtt  | gccgaggcgc  | tggccgggta | cgagctgcc   | 3960 |
| attcttgagt  | cccgtatcac  | gcagcgcgtg  | agctaccag   | gcactgccgc | cgccggcaca  | 4020 |
| accgttcttg  | aatcagaacc  | cgagggcgac  | gctgcccgcg  | aggtccaggc | gctggccgct  | 4080 |
| gaaattaaat  | caaaactcat  | ttgagttaat  | gaggtaaaga  | gaaaatgagc | aaaagcacia  | 4140 |
| acacgctaag  | tgccggccgt  | ccgagcgcac  | gcagcagcaa  | ggctgcaacg | ttggccagcc  | 4200 |
| tggcagacac  | gccagccatg  | aagcgggtca  | actttcagtt  | gccggcggag | gatcacacca  | 4260 |
| agctgaagat  | gtacgcggta  | cgccaaggca  | agaccattac  | cgagctgcta | tctgaataca  | 4320 |
| tcgcgagct   | accagagtaa  | atgagcaaat  | gaataaatga  | gtagatgaat | tttagcggct  | 4380 |
| aaaggaggcg  | gcatggaaaa  | tcaagaacaa  | ccaggcaccg  | acgccgtgga | atgccccatg  | 4440 |
| tgtggaggaa  | cgggcggttg  | gccaggcgta  | agcggctggg  | ttgtctgccg | gccctgcaat  | 4500 |
| ggcactggaa  | cccccaagcc  | cgaggaatcg  | gcgtgagcgg  | tcgcaaacca | tccggcccgg  | 4560 |
| tacaaatcgg  | cgcggcgctg  | ggtgatgacc  | tggtaggaa   | gttgaaggcc | gcgcaggccg  | 4620 |
| cccagcggca  | acgcacgcag  | gcagaagcac  | gccccggtga  | atcgtggcaa | gcggccgctg  | 4680 |
| atcgaatccg  | caaagaatcc  | cggcaaccgc  | cggcagccgg  | tcgcgccgtc | attaggaagc  | 4740 |
| cgcccaaggg  | cgacgagcaa  | ccagattttt  | tcgttccgat  | gctctatgac | gtgggcaccc  | 4800 |
| gcgatagtcg  | cagcatcatg  | gacgtggccg  | ttttccgtct  | gtcgaagcgt | gaccgacgag  | 4860 |
| ctggcgaggt  | gatccgctac  | gagcttccag  | acgggcacgt  | agaggtttcc | gcagggccgg  | 4920 |
| ccggcatggc  | cagtgtgtgg  | gattacgacc  | tggtactgat  | ggcggtttcc | catctaaccg  | 4980 |
| aatccatgaa  | ccgataccgg  | gaagggaagg  | gagacaagcc  | cggccgcgtg | ttccgtccac  | 5040 |
| acgttgcgga  | cgtactcaag  | ttctgccggc  | gagccgatgg  | cggaaagcag | aaagacgacc  | 5100 |
| tggtagaaac  | ctgcattcgg  | ttaaacacca  | cgcacgttgc  | catgcagcgt | acgaagaagg  | 5160 |
| ccaagaacgg  | ccgcctggtg  | acggtatccg  | agggtagaag  | cttgattagc | cgctacaaga  | 5220 |
| tcgtaaagag  | cgaacccggg  | cggccggagt  | acatcgagat  | cgagctagct | gattggatgt  | 5280 |
| accgcgagat  | cacagaaggc  | aagaacccgg  | acgtgctgac  | ggttcacccc | gattactttt  | 5340 |
| tgatcgatcc  | cggcatcggc  | cgttttctct  | accgcctggc  | acgccgcgcc | gcaggcaagg  | 5400 |
| cagaagccag  | atggttgttc  | aagacgatct  | acgaacgcag  | tggcagcgcc | ggagagttca  | 5460 |
| agaagtcttg  | tttcaccgtg  | cgcaagctga  | tcgggtcaaa  | tgacctgccg | gagtacgatt  | 5520 |
| tgaaggagga  | ggcggggcag  | gctggcccga  | tcctagtcat  | gcgctaccgc | aacctgatcg  | 5580 |
| agggcggaagc | atccgcgggt  | tcctaattga  | cggagcagat  | gctagggcaa | attgccctag  | 5640 |

```

caggggaaaa aggtcgaaaa ggtctctttc ctgtggatag cacgtacatt gggaacccaa 5700
agccgtacat tgggaaccgg aaccctgaca ttgggaaccc aaagccgtac attgggaacc 5760
ggtcacacat gtaagtgact gatataaaag agaaaaaagg cgattttttcc gcctaaaact 5820
ctttaaaact tattaaact cttaaaaccc gcttgccctg tgcataactg tctggccagc 5880
gcacagccga agagctgcaa aaagcgcta cccttcgggtc gctgcgctcc ctacgccccg 5940
ccgcttcgag tgggctatc ggggcccgtg gccgctcaaa aatggctggc ctacggccag 6000
gcaatctacc agggcgcgga caagccgagc cgtcgccact cgaccgcccg cgccacatc 6060
aaggcaccct gctcgcgcg tttcgggtgat gacggtgaaa acctctgaca catgcagctc 6120
ccggagacgg tcacagcttg tctgtaagcg gatgccggga gcagacaagc ccgtcagggc 6180
gcgtcagcgg gtgttgggcg gtgtcggggc gcagccatga cccagtcacg tagcgatagc 6240
ggagtgtata ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat tgtactgaga gtgcaccata 6300
tgccgtgtga aataccgcac agatgcgtaa ggagaaaata ccgcatcagg cgctcttccg 6360
cttcctcgct cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcgggt gggcgagcgg gtatcagctc 6420
actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt 6480
gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc 6540
ataggctccg ccccccgtac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa 6600
acccgacagg actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc 6660
ctgttccgac cctgcgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg 6720
cgctttctca tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg gtaggtcgtt cgctccaagc 6780
tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc 6840
gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca 6900
ggattagcag agcgaggtat gtaggcgggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact 6960
acggctacac tagaaggaca gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg 7020
gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtggttttt 7080
ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct 7140
tttctacggg gtctgacgct cagtggaaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatgc 7200
atgatataat tcccaatttg tgtagggctt attatgcacg cttaaaaata ataaaagcag 7260
acttgacctg atagtttggc tgtgagcaat tatgtgctta gtgcactctaa cgcttgagtt 7320
aagccgcgcc gcgaagcggc gtcggcttga acgaatttct agctagacat tatttgccga 7380
ctaccttggt gatctcgctt ttcacgtagt ggacaaattc ttccaactga tctgcgcgcg 7440
aggccaagcg atcttcttct tgtccaagat aagcctgtct agcttcaagt atgacgggct 7500
gatactgggc cggcagggcg tccattgccc agtcggcagc gacatccttc ggcgcgattt 7560
tgccggttac tgcgctgtac caaatgcggg acaacgtaag cactacattt cgctcatcgc 7620
cagcccagtc gggcgggcgag ttccatagcg ttaaggtttc atttagcgcc tcaaatagat 7680
cctgttcagg aaccggatca aagagttcct ccgcccgtgg acctaccaag gcaacgctat 7740
gttctcttgc ttttgcagc aagatagcca gatcaatgtc gatcgtggct ggctcgaaga 7800
tacctgcaag aatgtcattg cgctgccatt ctccaaattg cagttcgcgc ttagctggat 7860
aacgccacgg aatgatgtcg tcgtgcacaa caatggtgac ttctacagcg cggagaatct 7920
cgctctctcc aggggaagcc gaagtttcca aaaggtcggt gatcaaagct cgccgcgttg 7980
tttcatcaag ccttacggtc accgtaacca gcaaatcaat atcactgtgt ggcttcaggc 8040
cgccatccac tgcggagcgg tacaatatga cggccagcaa cgtcgggttcg agatggcgct 8100
cgatgacgcc aactacctct gatagttgag tcgatacttc ggcgacacc gcttccccca 8160
tgatgtttaa ctttgtttta gggcgactgc cctgctgcgt aacatcggtg ctgctccata 8220
acatcaaaca tcgaccacag gcgtaacgag cttgctgctt ggatgcccga ggcatagact 8280
gtaccccaaa aaaacagtca taacaagcca tgaaaaccgc cactgcg 8327

```

<210> 25

<211> 8441

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: binary  
plant expression vector

<400> 25

```

ttccatggac atacaaatgg acgaacggat aaaccttttc acgccctttt aaatatccga 60
ttattctaataaacgctctt ttctcttagg ttaccggcc aatatatcct gtcaaacact 120
gatagtttaa actgaaggcg ggaaacgaca atcagatcta gtaggaaaca gctatgacca 180

```

|             |             |             |             |             |             |      |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| tgattacgcc  | aagcttgc    | gccagcttga  | caggaggccc  | gatctagtaa  | catagatgac  | 240  |
| accgcgcgcg  | ataatttatc  | ctagtttgcg  | cgctatatatt | tgttttctat  | cgcgatttaa  | 300  |
| atgtataatt  | gcgggactct  | aatcataaaa  | acccatctca  | taaataacgt  | catgcattac  | 360  |
| atgttaatta  | ttacatgctt  | aacgtaattc  | aacagaaatt  | atatgataat  | catcgcaaga  | 420  |
| ccggcaacag  | gattcaatct  | taagaaactt  | tattgccaaa  | tgtttgaacg  | atcggggatc  | 480  |
| atccgggtct  | gtggcgggaa  | ctccacgaaa  | atatccgaac  | gcagcaagat  | cggtcgatcg  | 540  |
| actcagatct  | gggtaactgg  | cctaactggc  | cttgaggagg  | ctggcaactc  | aaaatccctt  | 600  |
| tgccaaaaac  | caacatcatg  | ccatccacca  | tgcttgatc   | cagccgcgcg  | caatgtaccc  | 660  |
| cgcgctgtgt  | atcccaaagc  | ctcatgcaac  | ctaacagatg  | gatcgtttgg  | aaggcctata  | 720  |
| acagcaacca  | cagacttaaa  | accttgcgcc  | tccatagact  | taagcaaatg  | tgtgtacaat  | 780  |
| gtagatccta  | ggcccaacct  | ttgatgccta  | tgtgacacgt  | aaacagtact  | ctcaactgtc  | 840  |
| caatcgtaag  | cgttcctagc  | cttcaggggc  | ccagcgtaag  | caataccagc  | cacaacaccc  | 900  |
| tcaacctcag  | caaccaacca  | agggatatcta | tcttgcaacc  | tctctagggtc | atcaatccac  | 960  |
| tcttgtgggtg | tttgtggctc  | tgtcctaaag  | ttcactgtag  | acgtctcaat  | gtaatgggta  | 1020 |
| acgatgtcac  | aaaccgcggc  | catatcggct  | gctgtagctg  | gcctaatactc | aactgggtctc | 1080 |
| ctctccggag  | acatgtcgac  | tctagactag  | tggatccgat  | atcgcccggg  | ctcgagggtac | 1140 |
| cgagctcgaa  | ttcactggcc  | gtcgttttac  | aacgactcag  | agcttgacag  | gaggcccgat  | 1200 |
| ctagtaacat  | agatgacacc  | gcgcgcgata  | atltatccta  | gtttgcgcgc  | tatatattgt  | 1260 |
| tttctatcgc  | gtattaaatg  | tataattgcg  | ggactctaata | cataaaaacc  | catctcataa  | 1320 |
| ataacgtcat  | gcattacatg  | ttaattatta  | catgcttaac  | gtaattcaac  | agaaattata  | 1380 |
| tgataatcat  | cgcaagaccg  | gcaacaggat  | tcaatcttaa  | gaaactttat  | tgccaaatgt  | 1440 |
| ttgaacgate  | ggggatcatc  | cgggtctgtg  | gcgggaactc  | cacgaaaata  | tccgaacgca  | 1500 |
| gcaagatcta  | gagcttgggt  | cccgtcaga   | agaactcgtc  | aagaaggcga  | tagaaggcga  | 1560 |
| tgcgctgcga  | atcgggagcg  | gcgataccgt  | aaagcacgag  | gaagcgggtca | gccatttcgc  | 1620 |
| cgccaagctc  | ttcagcaata  | tcacgggtag  | ccaacgctat  | gtcctgatag  | cgttcgcca   | 1680 |
| caccagcccg  | gccacagtcg  | atgaatccag  | aaaagcggcc  | atlttccacc  | atgatattcg  | 1740 |
| gcaagcaggc  | atcgccatgg  | gtcacgacga  | gatcctcgcc  | gtcgggcatg  | cgcgcttga   | 1800 |
| gcctggcgaa  | cagttcgggt  | ggcgcgagcc  | cctgatgtct  | ttcgtccaga  | tcacctgat   | 1860 |
| cgacaagacc  | ggcttccatc  | cgagtacgtg  | ctcgctcgat  | gcgatgtttc  | gcttgggtgg  | 1920 |
| cgaatgggca  | ggtagccgga  | tcaagcgtat  | gcagccgcgc  | cattgcatca  | gccatgatgg  | 1980 |
| atactttctc  | ggcaggagca  | aggtgagatg  | acaggagatc  | ctgccccggc  | acttcgcca   | 2040 |
| atagcagcca  | gtcccttccc  | gcttcagtga  | caacgtcgag  | cacagctgcg  | caaggaacgc  | 2100 |
| cgctcgtggc  | cagccacgat  | agccgcgctg  | cctcgtcctg  | cagttcattc  | agggcaccgg  | 2160 |
| acaggtcggg  | cttgacaaaa  | agaaccgggc  | gccctgcgc   | tgacagccgg  | aacacggcgg  | 2220 |
| catcagagca  | gccgattgtc  | tgttgtgccc  | agtcatagcc  | gaatagcctc  | tccacccaag  | 2280 |
| cggccggaga  | acctgcgtgc  | aatccatctt  | gttcaatcat  | gcgaaacgat  | ccagatccgg  | 2340 |
| tgagatttat  | ttggattgag  | agtgaatatg  | agactctaata | tggataccga  | ggggaattta  | 2400 |
| tggaacgtca  | gtggagcatt  | tttgacaaga  | aatatttgct  | agctgatagt  | gaccttaggc  | 2460 |
| gacttttgaa  | cgcgcaataa  | tggtttctga  | cgtatgtgct  | tagctcatta  | aactccagaa  | 2520 |
| accgcgggct  | gagtggtctc  | ttcaacgttg  | cggttctgtc  | agttccaaac  | gtaaaacggc  | 2580 |
| ttgtcccgcg  | tcateggcgg  | gggtcataac  | gtgactccct  | taattctccg  | ctcatgatca  | 2640 |
| gattgtcgtt  | tcccgccctc  | agtttaaact  | atcagtgttt  | gacaggatcc  | tgcttggtaa  | 2700 |
| taattgtcat  | tagattgttt  | ttatgcatag  | atgcactcga  | aatcagccaa  | ttttagacaa  | 2760 |
| gtatcaaacg  | gatgttaatt  | cagtacatta  | aagacgtccg  | caatgtgtta  | ttaagttgtc  | 2820 |
| taagcgtcaa  | tttgtttaca  | ccacaatata  | tcttgccacc  | agccagccaa  | cagctccccg  | 2880 |
| accggcagct  | cggcacaaaa  | tcaccacgcg  | ttaccaccac  | gccggccggc  | cgcattgggt  | 2940 |
| tgaccgtggt  | cgcgggcatt  | gccgagttcg  | agcgttccct  | aatcatcgac  | cgcacccgga  | 3000 |
| gcgggcgcga  | ggccgccaag  | gcccgaggcg  | tgaagtttgg  | ccccgcct    | accctcacc   | 3060 |
| cggcacagat  | cgcgcacgcc  | cgcgagctga  | tcgaccagga  | aggccgcacc  | gtgaaagagg  | 3120 |
| cggctgcaat  | gcttggcggtg | catcgctcga  | ccctgtaccg  | cgcacttgag  | cgcagcgagg  | 3180 |
| aagtgcgcgc  | caccgaggcc  | aggcggcgcg  | gtgccttccg  | tgaggacgca  | ttgaccgagg  | 3240 |
| ccgacgccct  | ggcggccgcc  | gagaatgaac  | gccaaagagga | acaagcatga  | aaccgcacca  | 3300 |
| ggacggccag  | gacgaaccgt  | ttttcattac  | cgaagagatc  | gaggcggaga  | tgatcgcggc  | 3360 |
| cgggtacgtg  | ttcgagccgc  | ccgcgcacgt  | ctcaaccgtg  | cggctgcatg  | aaatcctggc  | 3420 |
| cggtttgtct  | gatgccaaagc | tggcggcctg  | gccggccagc  | ttggccgctg  | aagaaaccga  | 3480 |
| gcgcgcgcgt  | ctaaaaaggt  | gatgtgtatt  | tgagtaaaac  | agcttgcgtc  | atgcgggtcg  | 3540 |
| tgcgatatatg | atgcgatgag  | taaataaaca  | aatacgcaag  | gggaacgcat  | gaagggttatc | 3600 |

|            |             |             |             |             |            |      |
|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------|
| gctgtactta | accagaaaagg | cgggtcaggc  | aagacgacca  | tgcgaaccca  | tctagcccgc | 3660 |
| gccctgcaac | tgcgcggggc  | cgatgttctg  | ttagtcgatt  | cggatcccca  | gggcagtgcc | 3720 |
| cgcgattggg | cggccgtgcg  | ggaagatcaa  | ccgctaaccg  | ttgtcggcat  | cgaccgcccg | 3780 |
| acgattgacc | gcgacgtgaa  | ggccatcggc  | cggcgcgact  | tcgtagtgat  | cgacggagcg | 3840 |
| ccccaggcgg | cggacttggc  | tgtgtccgcg  | atcaaggcag  | cggacttcgt  | gctgattccg | 3900 |
| gtgcagccaa | gcccttacga  | catatggggc  | accgccgacc  | tgggtggagct | ggttaagcag | 3960 |
| cgcattgagg | tcacggatgg  | aaggctacaa  | gcggcctttg  | tcggtgtcgcg | ggcgatcaaa | 4020 |
| ggcacgcgca | tgcggcggta  | ggttgccgag  | gcgctggccg  | ggtacgagct  | gccatttctt | 4080 |
| gagtcccgtg | tcacgcagcg  | cgtgagctac  | ccaggcactg  | ccgccgcccg  | cacaaccgtt | 4140 |
| cttgaatcag | aacccgaggg  | cgacgtgcc   | cgcgaggtcc  | aggcgctggc  | cgctgaaatt | 4200 |
| aaatcaaaac | tcatttgagt  | taatgaggta  | aagagaaaat  | gagcaaaagc  | acaaacacgc | 4260 |
| taagtgccgg | ccgtccgagc  | gcacgcagca  | gcaaggctgc  | aacgttggcc  | agcctggcag | 4320 |
| acacgccagc | catgaagcgg  | gtcaactttc  | agttgccggc  | ggaggatcac  | accaagctga | 4380 |
| agatgtacgc | ggtacgccaa  | ggcaagacca  | ttaccgagct  | gctatctgaa  | tacatcgcgc | 4440 |
| agctaccaga | gtaaatgagc  | aaatgaataa  | atgagtagat  | gaattttagc  | ggctaaagga | 4500 |
| ggcggcatgg | aaaatcaaga  | acaaccaggc  | accgacgccg  | tggaatgccc  | catgtgtgga | 4560 |
| ggaacgggcg | gttggccagg  | cgtaagcggc  | tgggttgtct  | gccggccctg  | caatggcact | 4620 |
| ggaaccccca | agcccgagga  | atcggcgtga  | gcggtcgcaa  | accatccggc  | ccggtacaaa | 4680 |
| tcggcgcggc | gctgggtgat  | gacctggtgg  | agaagttgaa  | ggccgcgcag  | gccgcccagc | 4740 |
| ggcaacgcat | cgaggcagaa  | gcacgccccg  | gtgaatcgtg  | gcaagcggcc  | gctgatcgaa | 4800 |
| tccgcaaaga | atcccgga    | ccgccggcag  | ccggtgcgcc  | gtcgattagg  | aagccgcca  | 4860 |
| agggcgacga | gcaaccagat  | tttttcgttc  | cgatgctcta  | tgacgtgggc  | accgcgata  | 4920 |
| gtcgcagcat | catggacgtg  | gccgttttcc  | gtctgtcgaa  | gcgtgaccga  | cgagctggcg | 4980 |
| aggtgatccg | ctacgagctt  | ccagacgggc  | acgtagaggt  | ttccgcaggg  | ccggccggca | 5040 |
| tggccagtgt | gtgggattac  | gacctggtac  | tgatggcggg  | ttcccatcta  | accgaatcca | 5100 |
| tgaaccgata | ccgggaaggg  | aagggaagaca | agcccgcccg  | cgtgttccgt  | ccacacgttg | 5160 |
| cggacgtact | caagttctgc  | cggcgagccg  | atggcgga    | gcagaaagac  | gacctggtag | 5220 |
| aaacctgcat | tcggttaa    | accacgcacg  | ttgccatgca  | gcgtacgaag  | aaggccaaga | 5280 |
| acggccgcct | ggtgacggta  | tccgaggggtg | aagccttgat  | tagccgctac  | aagatcgtaa | 5340 |
| agagcgaaac | cgggcggccg  | gagtacatcg  | agatcgagct  | agctgattgg  | atgtaccgcg | 5400 |
| agatcacaga | aggcaagaac  | ccggacgtgc  | tgacggttca  | ccccgattac  | tttttgatcg | 5460 |
| atcccgcat  | cggccgtttt  | ctctaccgcc  | tggcacgccg  | cgccgcaggc  | aaggcagaag | 5520 |
| ccagatgggt | gttcaagacg  | atctacgaac  | gcagtggcag  | cgccggagag  | ttcaagaagt | 5580 |
| tctgtttcac | cgtgcgcaag  | ctgatcgggt  | caaatgacct  | gccggagtac  | gatttgaagg | 5640 |
| aggaggcggg | gcaggctggc  | ccgatcctag  | tcatgcgcta  | ccgcaacctg  | atcgagggcg | 5700 |
| aagcatccgc | cggttcctaa  | tgtacggagc  | agatgctagg  | gcaaattgcc  | ctagcagggg | 5760 |
| aaaaaggctc | aaaaggctct  | tttctgtgg   | atagcacgta  | cattgggaac  | ccaaagccgt | 5820 |
| acattgggaa | ccggaaccgc  | tacattggga  | acccaaagcc  | gtacattggg  | aaccggtcac | 5880 |
| acatgtaagt | gactgatata  | aaagagaaaa  | aaggcgattt  | ttccgcctaa  | aactcttta  | 5940 |
| aacttattaa | aactcttaaa  | acccgcctgg  | cctgtgcata  | actgtctggc  | cagcgcacag | 6000 |
| ccgaagagct | gcaaaaagcg  | cctacccttc  | ggtcgtgcg   | ctccctacgc  | cccgcgcctt | 6060 |
| cgcgtcggcc | tatcgcggcc  | gctggccgct  | caaaaatggc  | tggcctacgg  | ccaggcaatc | 6120 |
| taccaggggc | cggacaagcc  | gcgccgtcgc  | cactcgaccg  | ccggcgccca  | catcaaggca | 6180 |
| ccctgcctcg | cgcgtttcgg  | tgatgacggt  | gaaaacctct  | gacacatgca  | gctcccggag | 6240 |
| acggtcacag | cttgtctgta  | agcggatgcc  | gggagcagac  | aagcccgctca | gggcgcgtca | 6300 |
| gcgggtgttg | gcgggtgtcg  | gggcgcagcc  | atgaccagct  | cacgtagcga  | tagcggagtg | 6360 |
| tatactggct | taactatgcg  | gcatcagagc  | agattgtact  | gagagtgcac  | catatgcggt | 6420 |
| gtgaaatacc | gcacagatgc  | gtaaggagaa  | aataccgcat  | caggcgctct  | tccgcttcc  | 6480 |
| cgtcactga  | ctcgtgcgc   | tcggtcgttc  | ggctgcggcg  | agcggtatca  | gctcactcaa | 6540 |
| aggcggtaat | acggttatcc  | acagaatcag  | gggataacgc  | aggaaagaac  | atgtgagcaa | 6600 |
| aaggccagca | aaaggccagg  | aaccgtaaaa  | aggccgcgtt  | gctggcgttt  | ttccataggc | 6660 |
| tccgcccccc | tgacgagcat  | cacaaaaatc  | gacgtcaag   | tcagagggtg  | cgaaacccga | 6720 |
| caggactata | aagataccag  | gcgtttcccc  | ctggaagctc  | cctcgtgcgc  | tctcctgttc | 6780 |
| cgaccctgcc | gcttaccgga  | tacctgtccg  | cctttctccc  | ttcgggaagc  | gtggcgcttt | 6840 |
| ctcatagctc | acgctgtagg  | tatctcagtt  | cgggtgtaggt | cggttcgctcc | aagctgggct | 6900 |
| gtgtgcacga | acccccggtt  | cagcccgacc  | gctgcgcctt  | atccggtaac  | tatcgtcttg | 6960 |
| agtccaaccc | ggtaagacac  | gacttatcgc  | cactggcagc  | agccactggt  | aacaggatta | 7020 |

```

gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct 7080
acactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa 7140
gagttggtag ctcttgatcc ggcaacaaa ccaccgctgg tagcggtggt ttttttggtt 7200
gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta 7260
cgggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gattttgggtc atgcatgata 7320
tatctcccaa tttgtgtagg gcttattatg cacgcttaaa aataataaaa gcagacttga 7380
cctgatagtt tggctgtgag caattatgtg cttagtgcac ctaacgcttg agttaagccg 7440
cgccgcgaag cggcgctggc ttgaacgaat ttctagctag acattatttg ccgactacct 7500
tggtgatctc gcctttcacg tagtggacaa attcttccaa ctgatctgcg cgcgaggcca 7560
agcgatcttc ttcttgcca agataagcct gtctagcttc aagtatgacg ggctgatact 7620
gggcccgcag gcgctccatt gccagtcgg cagcgacatc cttcggcgcg attttgccgg 7680
ttactgcgct gtaccaaagtg cgggacaacg taagcactac atttcgctca tcgccagccc 7740
agtcggggcg cgagttccat agcgtaagg tttcatttag cgcctcaaag agatcctgtt 7800
caggaaccgg atcaaagagt tcctccgccc ctggacctac caaggcaacg ctatgttctc 7860
ttgcttttgt cagcaagata gccagatcaa tgtcgatcgt ggctggctcg aagataacctg 7920
caagaatgtc attgcgctgc cattctccaa attgcagttc gcgcttagct ggataacgcc 7980
acggaatgat gtcgctcgtg acaacaatgg tgacttctac agcgcggaga atctcgtctc 8040
ctccagggga agccgaagtt tccaaaaggt cgttgatcaa agctcgcgcg gttgtttcat 8100
caagccttac ggtcacgta accagcaaat caatatcact gtgtggcttc aggccgccat 8160
ccactgcgga gccgtacaaa tgtacggcca gcaacgctcg ttcgagatgg cgctcgatga 8220
cgccaactac ctctgatagt tgagtcgata cttcggcgat caccgcttcc cccatgatgt 8280
ttaactttgt tttagggcga ctgccctgct gcgtaacatc gttgctgctc cataacatca 8340
aacatcgacc cagggcgtaa cgcgcttgct gcttgatgc cggaggcata gactgtaccc 8400
caaaaaaaca gtcataacaa gccatgaaaa ccgccactgc g 8441

```

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotid primer

&lt;400&gt; 26

aagtcgacgg atcctgatag cttataactca aattcaacaa gttat

45

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 1318

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; promoter

&lt;222&gt; (1) .. (1318)

&lt;223&gt; TPT truncated promoter

&lt;400&gt; 27

```

tgatagctta tactcaaatt caacaagtta tatataaatg tatagatact acaatatcat 60
taacaaaagt caccttaaat aaatacacat atcttttatg ttctctattg ttttgcgtac 120
gctaacacaa tttctcatat gcaaaaggat gaatgagtaa caaattacct cataagaaca 180
atcatctttg cttacatact aatacaataa tcactcaatc aaccaataac atcaatcaca 240
taggtttaca tacaataatc actcaatcaa cttcataaga agaatcatgt ttacttaatt 300
catcaattat ccccaaaaac accactatta agtataaact ataacatatt tgtagtgatg 360
ggtcaacatt tttatcatat ttaaactcgg gttccctcaa atcgagaaat agtgaacatg 420
taatattaat tttaaatcgc aattacagaa attaattgaa tttgggtcaa tggacagaat 480
tttatagatt ggggtggaact agaaaaaaa aaaaaaagag tatagggtga attgagtaca 540
tgaaagtaca tggtaatcct agttaaacgc ataatacatg tgggttcatt tgtatttttt 600
tgtaacttac gagtaaaact gctacaacaa aaaaaattag aagatttttt tgttttgtag 660
aaaaccctaa ttttagttat agttgtataa ctttgataaa attataaaat tgtattacga 720
aaaaagtaat aagatattca aaaaagccta gaataacgta tatgactatg agcatgaaac 780

```

```
tgcaagtcaa atgctgacag acaaccataa acaaaagaaa ttaaatagag atacctttta 840
aataagtaaa atttcattta taaaaaatct actttcttgt gaatctgtca cgttcaataa 900
tttgaagacc actcaacata caaggtaa atgaaaaat aaaatctacc aaaatttcaa 960
tcattattat cttccaaaaa aacaaaatta tacagatgat gatggtgata tggaacttcg 1020
attggcta attcactgtg tctctaaaaa ccatccactt atcaagataa gatggaccct 1080
acactcatcc aatctaaacc agtatctcaa gattcttata taattacatc attctctacc 1140
gttagatgaa attgaccatt aaccctacca taactccata caccgcgaga tactggatta 1200
accaaatcga gatcatcgta gccgtccgat caacaagtac catctcttga aatactcgaa 1260
atcctcataa gtccgtccct ctttgctctc actatcaaaa ctctgaattt cgatttca 1318
```

<210> 28

<211> 234

<212> DNA

<213> *Solanum tuberosum*

<220>

<221> terminator

<222> (1)..(234)

<223> terminators sequence of the Cathepsin D  
Inhibitor gene from potato

<400> 28

```
cctgcagata gactatacta tgtttttagcc tgctgtctgg ctagctacta tgttatgtta 60
tgttgtaaaa taaacacctg ctaagggtata tctatctata ttttagcatg gctttctcaa 120
taaattgtct ttccttatcg tttactatct tataccta atgaaataa taatatcaca 180
tatgaggaac ggggcaggtt taggcatata tatacgagt tagggcggag tggg 234
```

<210> 29

<211> 298

<212> DNA

<213> *Vicia faba*

<220>

<221> terminator

<222> (1)..(298)

<223> terminator of storage protein gene Vf1ElB3 from  
*Vicia faba*

<400> 29

```
gacccgtcaa tagaatgttg aggtgaccac tttctgtaat aaaataatta taaaataaat 60
ttagaattgc ttagtcaag aacatcagtt ctaaaatatt aataaagtta tggccttttg 120
acatatgtgt ttcgataaaa aaatcaaaat aaattgagat ttattcgaaa tacaatgaaa 180
gtttgcagat atgagatatg tttctacaaa ataataactt aaaactcaac tatatgctaa 240
tgtttttctt ggtgtgtttc atagaaaatt gtatccgttt cttagaaaat gctcgtaa 298
```

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/07527

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C12N15/82 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EMBL, BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                        | Relevant to claim No. |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X          | DATABASE EMBL 'Online!<br>4 July 1997 (1997-07-04)<br>retrieved from EMBL<br>Database accession no. Z97337<br>XP002214553<br>abstract     | 1-30                  |
| X          | DATABASE EMBL 'Online!<br>10 March 1998 (1998-03-10)<br>retrieved from EMBL<br>Database accession no. AB011474<br>XP002214554<br>abstract | 1-30                  |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 October 2002

Date of mailing of the international search report

18/10/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Heder, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/07527

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                            | Relevant to claim No. |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X          | DATABASE EMBL 'Online!<br>2 September 1997 (1997-09-02)<br>retrieved from EMBL<br>Database accession no. AB006698<br>XP002214555<br>abstract<br>---                                                                                                                                                           | 1-30                  |
| X          | WO 99 31258 A (STUIVER MAARTEN HENDRIK<br>;MOGEN INT (NL); SIJBOLTS FLOOR HENDRIK<br>(N) 24 June 1999 (1999-06-24)<br>page 13<br>the whole document                                                                                                                                                           | 1-30<br>1-30          |
| Y          | page 15 -page 16<br>example 1<br>example 5<br>example 9<br>---                                                                                                                                                                                                                                                |                       |
| Y          | ELLIOTT R C ET AL: "CIS-ACTING ELEMENTS<br>FOR LIGHT REGULATION OF PEA FERREDOXIN I<br>GENE EXPRESSION ARE LOCATED WITHIN<br>TRANSCRIBED SEQUENCES"<br>PLANT CELL,<br>vol. 1, no. 7, 1989, pages 691-698,<br>XP002214681<br>ISSN: 1040-4651<br>the whole document<br>---                                      | 1-30                  |
| Y          | LUEBBERSTEDT THOMAS ET AL: "Promoters<br>from genes for plastid proteins possess<br>regions with different sensitivities<br>toward red and blue light."<br>PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE),<br>vol. 104, no. 3, 1994, pages 997-1006,<br>XP002214550<br>ISSN: 0032-0889<br>the whole document<br>figure 1<br>--- | 1-30                  |
| Y          | PETRACEK MARIE E ET AL: "Light-regulated<br>changes in abundance and polyribosome<br>association of ferredoxin mRNA are<br>dependent on photosynthesis."<br>PLANT CELL,<br>vol. 9, no. 12, December 1997 (1997-12),<br>pages 2291-2300, XP002214551<br>ISSN: 1040-4651<br>the whole document<br>---<br>-/--   | 1-30                  |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 02/07527

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                             | Relevant to claim No. |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y          | <p>GALLO-MEAGHER M ET AL: "THE PEA FERREDOXIN I GENE EXHIBITS DIFFERENT LIGHT RESPONSES IN PEA AND TOBACCO"<br/>PLANT CELL,<br/>vol. 4, no. 4, 1992, pages 383-388,<br/>XP002214552<br/>ISSN: 1040-4651<br/>the whole document</p> <p>----</p>                                                                                 | 1-30                  |
| A          | <p>US 6 229 067 B1 (EBNETH MARCUS ET AL)<br/>8 May 2001 (2001-05-08)</p> <p>----</p>                                                                                                                                                                                                                                           |                       |
| A          | <p>HOLTORF S ET AL: "COMPARISON OF DIFFERENT CONSTITUTIVE AND INDUCIBLE PROMOTERS FOR THE OVEREXPRESSION OF TRANSGENES IN ARABIDOPSIS THALIANA"<br/>PLANT MOLECULAR BIOLOGY, NIJHOFF PUBLISHERS, DORDRECHT, NL,<br/>vol. 29, 1 November 1995 (1995-11-01),<br/>pages 637-646, XP002036874<br/>ISSN: 0167-4412</p> <p>-----</p> |                       |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

| Patent document<br>cited in search report |    | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|----|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9931258                                | A  | 24-06-1999          | AU 1968099 A               | 05-07-1999          |
|                                           |    |                     | BR 9813502 A               | 10-10-2000          |
|                                           |    |                     | CA 2313465 A1              | 24-06-1999          |
|                                           |    |                     | CN 1285876 T               | 28-02-2001          |
|                                           |    |                     | WO 9931258 A1              | 24-06-1999          |
|                                           |    |                     | EP 1038013 A1              | 27-09-2000          |
|                                           |    |                     | HU 0100326 A2              | 28-06-2001          |
|                                           |    |                     | JP 2002508186 T            | 19-03-2002          |
|                                           |    |                     | PL 341802 A1               | 07-05-2001          |
|                                           |    |                     | ZA 9811228 A               | 14-06-1999          |
| -----                                     |    |                     |                            |                     |
| US 6229067                                | B1 | 08-05-2001          | DE 19644478 A1             | 30-04-1998          |
|                                           |    |                     | AU 743558 B2               | 31-01-2002          |
|                                           |    |                     | AU 6909198 A               | 22-05-1998          |
|                                           |    |                     | BR 9712656 A               | 26-10-1999          |
|                                           |    |                     | WO 9818940 A1              | 07-05-1998          |
|                                           |    |                     | EP 0938569 A1              | 01-09-1999          |
|                                           |    |                     | JP 2001502551 T            | 27-02-2001          |
|                                           |    |                     | US 2002120955 A1           | 29-08-2002          |
| -----                                     |    |                     |                            |                     |

The International Searching Authority has determined that this international application contains more than one invention or group of inventions, namely

1. Claims 1-30 (all in part)

INVENTION 1

isolated nucleic acid sequence of SEQ ID NO: 1 or 4, derived from the *Arabidopsis thaliana* ferredoxin I (Fed-1, pFD) promoter; uses of said nucleic acid sequences.

2. Claims 1, 3-13 and 15-30 (all in part)

INVENTION 2

isolated nucleic acid sequence of SEQ ID NO: 2, derived from the *Arabidopsis thaliana* ferredoxin NADPH reductase (FNR) promoter; uses of said nucleic acid sequence.

3. Claims 1-30 (all in part)

isolated nucleic acid sequence of SEQ ID NO: 3 or 27, derived from the *Arabidopsis thaliana* triose phosphate translocator (TPT) promoter; uses of said nucleic acid sequences.

Continuation of I.2

Claims: 1, 3-13 and 15-30

disclosed in the application (PCT Article 5). In the present case the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it appears impossible to carry out a reasonable search covering the entire range of protection sought. Therefore, the search was directed to the parts of the claims that appear supported and disclosed in the above sense, that is the parts that pertain to nucleotide sequences of SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 and 27.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP02/07527

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
The term "organism" in Claim 21 would also, in the present formulation, include human beings. Claims directed to human beings are inadmissible, and so the subject matter corresponding thereto has been excluded from the search. 1, 3-13, 15-30
2. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
**see supplemental sheet further data PCT/ISA/210**
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

**see supplemental sheet**

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/07527

| Patent document<br>cited in search report |    | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|----|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9931258                                | A  | 24-06-1999          | AU 1968099 A               | 05-07-1999          |
|                                           |    |                     | BR 9813502 A               | 10-10-2000          |
|                                           |    |                     | CA 2313465 A1              | 24-06-1999          |
|                                           |    |                     | CN 1285876 T               | 28-02-2001          |
|                                           |    |                     | WO 9931258 A1              | 24-06-1999          |
|                                           |    |                     | EP 1038013 A1              | 27-09-2000          |
|                                           |    |                     | HU 0100326 A2              | 28-06-2001          |
|                                           |    |                     | JP 2002508186 T            | 19-03-2002          |
|                                           |    |                     | PL 341802 A1               | 07-05-2001          |
|                                           |    |                     | ZA 9811228 A               | 14-06-1999          |
| <hr/>                                     |    |                     |                            |                     |
| US 6229067                                | B1 | 08-05-2001          | DE 19644478 A1             | 30-04-1998          |
|                                           |    |                     | AU 743558 B2               | 31-01-2002          |
|                                           |    |                     | AU 6909198 A               | 22-05-1998          |
|                                           |    |                     | BR 9712656 A               | 26-10-1999          |
|                                           |    |                     | WO 9818940 A1              | 07-05-1998          |
|                                           |    |                     | EP 0938569 A1              | 01-09-1999          |
|                                           |    |                     | JP 2001502551 T            | 27-02-2001          |
|                                           |    |                     | US 2002120955 A1           | 29-08-2002          |
| <hr/>                                     |    |                     |                            |                     |

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/07527

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/82 A01H5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EMBL, BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile                                                           | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| X          | <p>DATABASE EMBL 'Online!<br/>4. Juli 1997 (1997-07-04)<br/>retrieved from EMBL<br/>Database accession no. Z97337<br/>XP002214553<br/>Zusammenfassung</p>    | 1-30               |
| X          | <p>DATABASE EMBL 'Online!<br/>10. März 1998 (1998-03-10)<br/>retrieved from EMBL<br/>Database accession no. AB011474<br/>XP002214554<br/>Zusammenfassung</p> | 1-30               |



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*G\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

1. Oktober 2002

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

18/10/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Heder, A

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/07527

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie° | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile                                                                                                                                                                                                                                         | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| X          | <p>DATABASE EMBL 'Online!<br/>2. September 1997 (1997-09-02)<br/>retrieved from EMBL<br/>Database accession no. AB006698<br/>XP002214555<br/>Zusammenfassung</p> <p>---</p>                                                                                                                                                                | 1-30               |
| X          | <p>WO 99 31258 A (STUIVER MAARTEN HENDRIK<br/>;MOGEN INT (NL); SIJBOLTS FLOOR HENDRIK<br/>(N) 24. Juni 1999 (1999-06-24)<br/>Seite 13</p>                                                                                                                                                                                                  | 1-30               |
| Y          | <p>das ganze Dokument<br/>Seite 15 -Seite 16<br/>Beispiel 1<br/>Beispiel 5<br/>Beispiel 9</p> <p>---</p>                                                                                                                                                                                                                                   | 1-30               |
| Y          | <p>ELLIOTT R C ET AL: "CIS-ACTING ELEMENTS<br/>FOR LIGHT REGULATION OF PEA FERREDOXIN I<br/>GENE EXPRESSION ARE LOCATED WITHIN<br/>TRANSCRIBED SEQUENCES"<br/>PLANT CELL,<br/>Bd. 1, Nr. 7, 1989, Seiten 691-698,<br/>XP002214681<br/>ISSN: 1040-4651<br/>das ganze Dokument</p> <p>---</p>                                                | 1-30               |
| Y          | <p>LUEBBERSTEDT THOMAS ET AL: "Promoters<br/>from genes for plastid proteins possess<br/>regions with different sensitivities<br/>toward red and blue light."<br/>PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE),<br/>Bd. 104, Nr. 3, 1994, Seiten 997-1006,<br/>XP002214550<br/>ISSN: 0032-0889<br/>das ganze Dokument<br/>Abbildung 1</p> <p>---</p>       | 1-30               |
| Y          | <p>PETRACEK MARIE E ET AL: "Light-regulated<br/>changes in abundance and polyribosome<br/>association of ferredoxin mRNA are<br/>dependent on photosynthesis."<br/>PLANT CELL,<br/>Bd. 9, Nr. 12, Dezember 1997 (1997-12),<br/>Seiten 2291-2300, XP002214551<br/>ISSN: 1040-4651<br/>das ganze Dokument</p> <p>---</p> <p>---<br/>-/--</p> | 1-30               |

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie° | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile                                                                                                                                                                                                                                 | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| Y          | <p>GALLO-MEAGHER M ET AL: "THE PEA FERREDOXIN I GENE EXHIBITS DIFFERENT LIGHT RESPONSES IN PEA AND TOBACCO"</p> <p>PLANT CELL,<br/>Bd. 4, Nr. 4, 1992, Seiten 383-388,<br/>XP002214552<br/>ISSN: 1040-4651<br/>das ganze Dokument</p> <p>----</p>                                                                                  | 1-30               |
| A          | <p>US 6 229 067 B1 (EBNETH MARCUS ET AL)<br/>8. Mai 2001 (2001-05-08)</p> <p>----</p>                                                                                                                                                                                                                                              |                    |
| A          | <p>HOLTORF S ET AL: "COMPARISON OF DIFFERENT CONSTITUTIVE AND INDUCIBLE PROMOTERS FOR THE OVEREXPRESSION OF TRANSGENES IN ARABIDOPSIS THALIANA"</p> <p>PLANT MOLECULAR BIOLOGY, NIJHOFF PUBLISHERS, DORDRECHT, NL,<br/>Bd. 29, 1. November 1995 (1995-11-01),<br/>Seiten 637-646, XP002036874<br/>ISSN: 0167-4412</p> <p>-----</p> |                    |

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-30 (alle teilweise)

ERFINDUNG 1

Isolierte Nucleinsäuresequenz der SEQ ID NO: 1 oder 4, abgeleitet vom Arabidopsis thaliana Ferredoxin I- (Fed-1, pFD) Promotor; Anwendungen besagter Nucleinsäuresequenzen.

2. Ansprüche: 1, 3-13, 15-30 (alle teilweise)

ERFINDUNG 2

Isolierte Nucleinsäuresequenz der SEQ ID NO: 2, abgeleitet vom Arabidopsis thaliana Ferredoxin NADPH Reduktase- (FNR-) Promotor; Anwendungen besagter Nucleinsäuresequenz.

3. Ansprüche: 1-30 (alle teilweise)

ERFINDUNG 3

Isolierte Nucleinsäuresequenz der SEQ ID NO: 3 oder 27, abgeleitet vom Arabidopsis thaliana Triosephosphat-Translokator- (TPT) Promotor; Anwendungen besagter Nucleinsäuresequenzen.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 1, 3-13, 15-30

Die geltenden Patentansprüche 1, 3-13, und 15-30 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Nucleotidsequenzen, von denen sich nur ein kleiner Anteil im Sinne von Art. 6 PCT auf die Beschreibung stützen und als im Sinne von Art. 5 PCT in der Patentanmeldung offenbart gelten kann. Im vorliegenden Fall fehlt den Patentansprüchen die entsprechende Stütze und fehlt der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als gestützt und offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend, die Nucleotidsequenzen der SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 und 27 zum Gegenstand haben.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 02/07527

### Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. 1, 3-13, 15-30  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
Der Terminus "Organismus" in Anspruch 21 würde in der vorliegenden Formulierung auch den Menschen umfassen. Auf den Menschen gerichtete Patentansprüche sind nicht zulässig, der Gegenstand wurde insoweit von der Recherche ausgeschlossen.
2. ☒ Ansprüche Nr. 1, 3-13, 15-30  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.   
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

### Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☒ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

#### Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

# INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/07527

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie | Datum der<br>Veröffentlichung |
|----------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO 9931258 A                                       | 24-06-1999                    | AU 1968099 A                      | 05-07-1999                    |
|                                                    |                               | BR 9813502 A                      | 10-10-2000                    |
|                                                    |                               | CA 2313465 A1                     | 24-06-1999                    |
|                                                    |                               | CN 1285876 T                      | 28-02-2001                    |
|                                                    |                               | WO 9931258 A1                     | 24-06-1999                    |
|                                                    |                               | EP 1038013 A1                     | 27-09-2000                    |
|                                                    |                               | HU 0100326 A2                     | 28-06-2001                    |
|                                                    |                               | JP 2002508186 T                   | 19-03-2002                    |
|                                                    |                               | PL 341802 A1                      | 07-05-2001                    |
|                                                    |                               | ZA 9811228 A                      | 14-06-1999                    |
| <hr/>                                              |                               |                                   |                               |
| US 6229067 B1                                      | 08-05-2001                    | DE 19644478 A1                    | 30-04-1998                    |
|                                                    |                               | AU 743558 B2                      | 31-01-2002                    |
|                                                    |                               | AU 6909198 A                      | 22-05-1998                    |
|                                                    |                               | BR 9712656 A                      | 26-10-1999                    |
|                                                    |                               | WO 9818940 A1                     | 07-05-1998                    |
|                                                    |                               | EP 0938569 A1                     | 01-09-1999                    |
|                                                    |                               | JP 2001502551 T                   | 27-02-2001                    |
|                                                    |                               | US 2002120955 A1                  | 29-08-2002                    |
| <hr/>                                              |                               |                                   |                               |