



(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 15/53, 15/54, 15/82, 9/10, 9/04, C12Q 1/02, A01H 5/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/08169 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 17. Februar 2000 (17.02.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/05467 (22) Internationales Anmeldedatum: 30. Juli 1999 (30.07.99) (30) Prioritätsdaten: 198 35 219.0 5. August 1998 (05.08.98) DE 198 45 216.0 1. Oktober 1998 (01.10.98) DE 198 45 231.4 1. Oktober 1998 (01.10.98) DE 198 45 224.1 1. Oktober 1998 (01.10.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SUN- GENE GMBH & CO.KGAA [DE/DE]; Corrensstrasse 3, D-06468 Gatersleben (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): REINDL, Andreas [DE/DE]; Albertine-Scherer-Strasse 21, D-67134 Birkenheide (DE). MEJIA, Patricia Leon [MX/MX]; Ganzalo de Sandoval 226, Cuernavaca, Morelos 62250 (MX). PALMAS, Juan Manuel Esteves [MX/MX]; Entrada a Ojo de Agua Col., Loma Bonita Tecamac Estado (MX). GRACIA, Maria Araceli Canter [MX/MX]; 2da Privad Los Pinos 22, Loma Bonita Cuernavaca, Morelos 62210 (MX). EBNETH, Mar- cus [DE/DE]; Bicklingerweg 16, D-06486 Quedlinburg (DE). HERBERS, Karin [DE/DE]; Am Hange 6, D-06484 Quedlinburg (DE).		(74) Anwalt: LANGFINGER, Klaus-Dieter; BASF Aktienge- sellschaft, D-67056 Ludwigshafen (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, GE, HR, HU, ID, IL, IN, JP, KR, KZ, LT, LV, MK, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, UA, US, ZA, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen</i> <i>Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen</i> <i>eintreffen.</i>
(54) Title: DNA SEQUENCE CODING FOR A 1-DEOXY-D-XYLULOSE-5-PHOSPHATE SYNTHASE AND THE OVERPRODUC- TION THEREOF IN PLANTS		
(54) Bezeichnung: DNA-SEQUENZ KODIEREND FÜR EINE 1-DEOXY-D-XYLULOSE-5-PHOSPHAT SYNTHASE UND DEREN ÜBERPRODUKTION IN PFLANZEN		
Binärer Vektor zur Überexpression des DOXS-Gens aus <i>E. coli</i> , des GGPPOR-Gens aus <i>Arabidopsis thaliana</i> und des HPPD-Gens aus <i>Strepto-</i> <i>myces avermitilis</i> in den Plastiden transgener Pflanzen.		
BINARY VECTOR FOR OVEREXPRESSING THE DOXS-GENE FROM <i>E. COLI</i> , THE GGPPOR GENE FROM <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> AND THE HPPD GENE FROM <i>STREPTOMYCES AVERMITILIS</i> IN THE PLASTIDS OF TRANSGENIC PLANTS		
(57) Abstract Method for the production of plants with enhanced vitamin E biosynthesis efficiency by overproduction of a 1-de- oxy-D-xylulose-5-phosphate synthase gene from Arabidopsis or <i>E. coli</i> .		

(57) Zusammenfassung

Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Vitamin E Biosyntheseleistung durch Überexpression eines pflanzlichen 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase-Gens aus Arabidopsis bzw. E. coli.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

DNA-Sequenz kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase und deren Überproduktion in Pflanzen

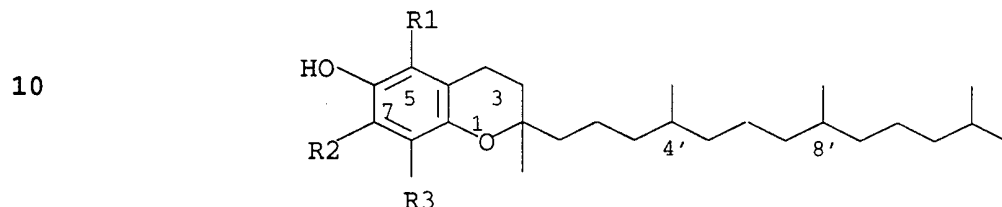
5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-,
10 Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, speziell die Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder einer mit dieser hybridisierenden DNA-Sequenz, die Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen
15 kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) und eine p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden, die Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und einer DNA-Sequenz SEQ ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen
20 kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) und eine Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden, die Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3,
25 einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 5 und einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS), eine Hydroxyphe-nylpyruvat Dioxygenase (HPPD) und eine Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR) zur Herstellung von Pflanzen mit
30 erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden, Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3; SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5; SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 7 bzw. eine DNA-Sequenz SEQ-ID
35 No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7, die derart hergestellten Pflanzen selbst, sowie die Verwendung der SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 zur Herstellung eines Testsystems
40 zur Identifizierung von Inhibitoren der DOXS.

Ein wichtiges Ziel pflanzenmolekulargenetischer Arbeiten ist bisher die Erzeugung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Zuckern, Enzymen und Aminosäuren. Wirtschaftlich interessant ist jedoch
45 auch die Entwicklung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Vitaminen, wie z.B. der Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes.

2

Die in der Natur vorkommenden acht Verbindungen mit Vitamin E-Aktivität sind Derivate des 6-Chromanols (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A 27 (1996), VCH Verlagsgesellschaft, Chapter 4., 478-488, Vitamin E). Die erste Gruppe (1a-d) stammt von Tocopherol ab, die zweite Gruppe besteht aus Derivaten des Tocotrienols (2a- d):



15

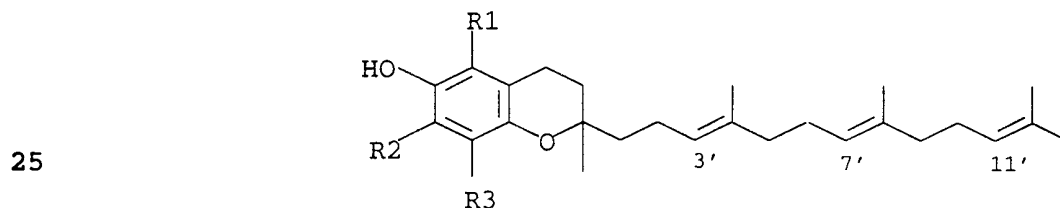
1a, α -Tocopherol: $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$

1b, β -Tocopherol [148-03-8]: $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$

1c, γ -Tocopherol [54-28-4]: $R^1 = \text{H}$, $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$

1d, δ -Tocopherol [119-13-1]: $R^1 = R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_3$

20



2a, α -Tocotrienol [1721-51-3]: $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$

30 2b, β -Tocotrienol [490-23-3]: $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$

2c, γ -Tocotrienol [14101-61-2]: $R^1 = \text{H}$, $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$

2d, δ -Tocotrienol [25612-59-3]: $R^1 = R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_3$

Wirtschaftlich große Bedeutung besitzt α -Tocopherol.

35

Der Entwicklung von Kulturpflanzen mit erhöhtem Tocopherol-Gehalt durch Gewebekultur oder Samenmutagenese und natürliche Auswahl sind Grenzen gesetzt. So muß einerseits der Tocopherol-Gehalt bereits in Gewebekultur erfaßbar sein und andererseits können nur diejenigen Pflanzen über Gewebekulturtechniken manipuliert werden, deren Regeneration zu ganzen Pflanzen aus Zellkulturen gelingt. Außerdem können Kulturpflanzen nach Mutagenese und Selektion unerwünschte Eigenschaften zeigen, die durch teilweise mehrmalige Rückkreuzungen wieder beseitigt werden müssen. Auch wäre die Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes durch Kreuzung auf Pflanzen der selben Art beschränkt.

3

Aus diesen Gründen ist das gentechnische Vorgehen, ein für die Tocopherol Syntheseleistung kodierendes, essentielles Biosynthesegen zu isolieren und in Kulturpflanzen gezielt zu übertragen, dem klassischen Züchtungsverfahren überlegen. Dieses Verfahren
5 setzt voraus, daß die Biosynthese und deren Regulation bekannt ist und daß Gene, die die Biosyntheseleistung beeinflussen, identifiziert werden.

Isoprenoide oder Terpenoide bestehen aus verschiedenen Klassen
10 lipidlöslicher Moleküle und werden teilweise oder vollständig aus C₅-Isopren-Einheiten gebildet. Reine Prenyllipide (z.B. Carotinoide) bestehen aus C-Skeletten, die ausschließlich auf Isopren-Einheiten zurückgehen, während gemischte Prenyllipide (z.B. Chlorophyll) eine Isoprenoid-Seitenkette besitzen, die mit
15 einem aromatischen Kern verbunden ist.

Ausgangspunkt der Biosynthese von Prenyllipiden sind 3 x Acetyl-CoA Einheiten, die über β -Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) und Mevalonat in die Ausgangs-Isopren-Einheit (C₅), dem Isopentenylpyrophosphat (IPP), umgewandelt werden. Kürzlich wurde durch in
20 vivo Fütterungsexperimente mit C¹³ gezeigt, daß in verschiedenen Eubakterien, Grünalgen und pflanzlichen Chloroplasten ein Mevalonat-unabhängiger Weg zur Bildung von IPP beschritten wird:

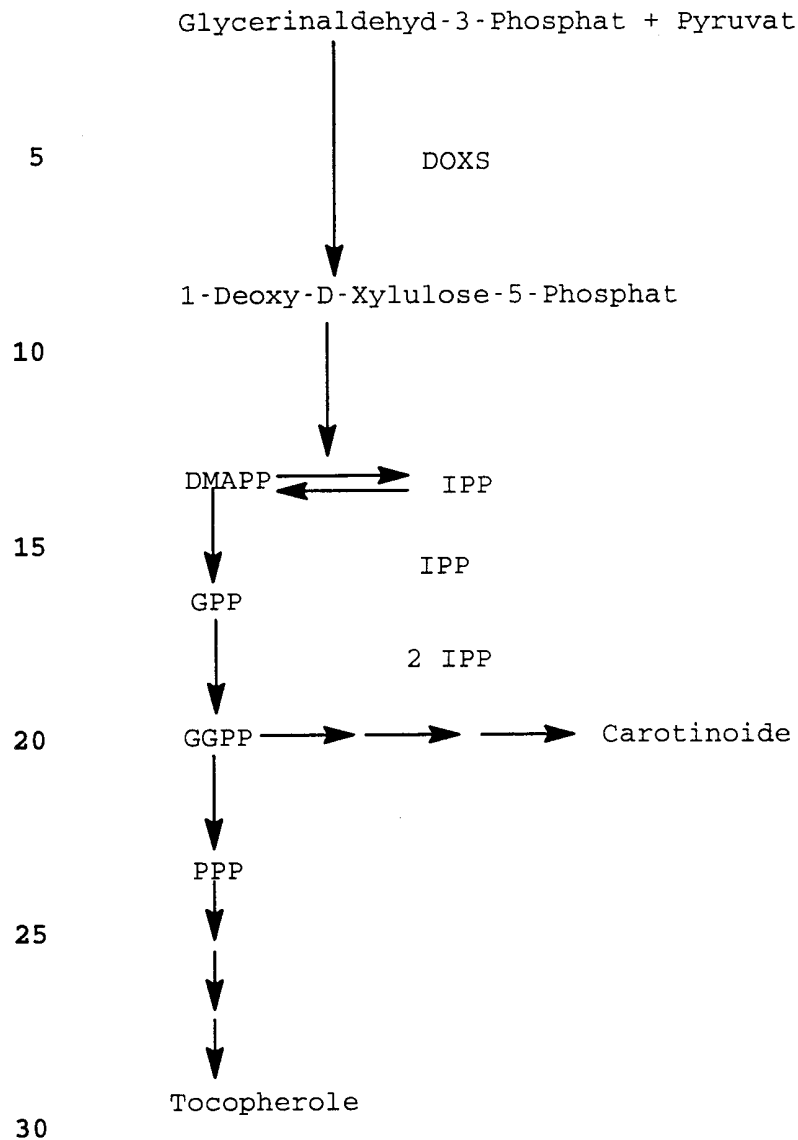
25

30

35

40

45



Dabei werden Hydroxyethylthiamin, das durch Decarboxylierung von Pyruvat entsteht, und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (3-GAP) in einer durch die 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase vermittelten

- 35 "Transketolase"-Reaktion zunächst in 1-Deoxy-D-Xylulose-5-phosphat umgewandelt (Schwender et al., FEBS Lett. 414(1), 129-134(1997); Arigoni et al., Proc.Natl.Acad.Sci USA 94(2), 10600-10605 (1997); Lange et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95(5), 2100-2104(1998); Lichtenthaler et al., FEBS Lett. 400(3), 40 271-274(1997)). Dieses wird dann durch eine intramolekulare Umordnung in IPP umgesetzt (Arigoni et al., 1997). Biochemische Daten deuten darauf hin, daß der Mevalonat-Weg im Zytosol operiert und zur Bildung von Phytosterolen führt. Das Antibiotikum Mevinolin, ein spezifischer Inhibitor der Mevalonat-Bildung, führt lediglich
- 45 zur Inhibition der Sterol-Biosynthese im Zytoplasma, während die Prenyllipid-Bildung in den Plastiden unbeeinflusst ist (Bach und Lichtenthaler, Physiol. Plant 59(1983), 50-60. Der Mevalonat-

unabhängige Weg ist dagegen plastidär lokalisiert und führt vornehmlich zur Bildung von Carotinoiden und plastidären Prenyl-lipiden (Schwender et al., 1997; Arigoni et al., 1997).

- 5 IPP steht im Gleichgewicht mit seinem Isomer, dem Dimethylallyl Pyrophosphat (DMAPP). Eine Kondensation von IPP mit DMAPP in Kopf-Schwanz Anlagerung ergibt das Monoterpen (C₁₀) Geranyl-Pyrophosphat (GPP). Die Addition von weiteren IPP Einheiten führt zum Sesquiterpen (C₁₅) Farnesy-Pyrophosphat (FPP) und zum Diterpen
10 (C₂₀) Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat (GGPP). Die Verknüpfung zweier GGPP Moleküle führt zur Bildung der C₄₀-Vorläufer für Carotinoide. GGPP wird durch eine Prenylketten-Hydrogenase zum Phytanyl-Pyrophosphat (PPP) umgeformt, dem Ausgangsstoff für die weitere Bildung von Tocopherolen.

- 15 Bei den Ringstrukturen der gemischten Prenyllipide, die zur Bildung der Vitamine E und K führen, handelt es sich um Quinone, deren Ausgangsmetabolite aus dem Shikimat-Weg stammen. Die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin bzw. Tyrosin werden in Hydroxy-
20 phenyl-Pyruvat umgewandelt, welches durch Dioxygenierung in Homogentisinsäure überführt wird. Diese wird an PPP gebunden, um den Vorläufer von α -Tocopherol und α -Tocoquinon, das 2-Methyl-6-phytylquinol, zu bilden. Durch Methylierungsschritte mit S-Adenosylmethionin als Methyl-Gruppen-Donor entsteht zunächst
25 2,3-Dimethyl-6-phytylquinol, dann durch Zyklisierung γ -Tocopherol und durch nochmalige Methylierung α -Tocopherol (Richter, Biochemie der Pflanzen, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1996).

- In der Literatur finden sich Beispiele die zeigen, daß die Manipulation eines Enzyms den Metabolit-Fluß directional beeinflussen
30 kann. In Experimenten mit einer veränderten Expression der Phytoen Synthase, welche zwei GGPP-Moleküle zu 15-cis-Phytoen miteinander verknüpft, konnte ein direkter Einfluß auf die Carotinoid-Mengen dieser transgenen Tomatenpflanzen gemessen
35 werden (Fray und Grierson, Plant Mol.Biol.22(4),589-602(1993); Fray et al., Plant J., 8, 693-701(1995). Wie zu erwarten, zeigen transgene Tabakpflanzen mit verringerten Mengen an Phenylalanin-Ammonium Lyase reduzierte Phenylpropanoid-Mengen. Das Enzym Phenylalanin-Ammonium Lyase katalysiert den Abbau von Phenyl-
40 alanin, entzieht es also der Phenylpropanoid-Biosynthese (Bate et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 91 (16): 7608-7612 (1994); Howles et al., Plant Physiol. 112. 1617-1624(1996).

- Über die Erhöhung des Metabolitflusses zur Steigerung des Tocopherol-Gehaltes in Pflanzen durch Überexpression einzelner
45 Biosynthesegene ist bisher wenig bekannt. Lediglich WO 97/27285 beschreibt eine Modifikation des Tocopherol-Gehaltes durch

6

verstärkte Expression bzw. durch Herunterregulation des Enzyms p-Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase (HPPD).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Entwicklung einer
5 transgenen Pflanze mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und Carotinoiden.

Die Aufgabe wurden überraschenderweise gelöst durch die Überexpression eines 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS)-
10 Gens in den Pflanzen.

Um den Metabolit-Fluß aus dem Primärstoffwechsel in den Isoprenoid-Stoffwechsel zu verstärken, wurde die Bildung von IPP als allgemeines Ausgangssubstrat für alle plastidären Isoprenoide
15 erhöht. Zu diesem Zweck wurde in Pflanzen die Aktivität der DOXS durch Überexpression des homologen Gens (Gen aus Organismus der selben Art) erhöht. Dies kann auch durch die Expression eines heterologen Gens (Gens aus entfernten Organismen) erreicht werden. Nukleotidsequenzen sind aus Arabidopsis thaliana DOXS
20 (Acc. No. U 27099), Reis (Acc. No. AF024512) und Pfefferminze (Acc. No. AF019383) beschrieben.

In einem Ausführungsbeispiel 1 wird das DOXS-Gen aus Arabidopsis thaliana (SEQ-ID No.:1; Mandel et al, Plant J. 9, 649-658(1996);
25 Acc. No. U27099) in transgenen Pflanzen verstärkt exprimiert. Eine Plastidenlokalisierung ist durch die in der Gensequenz enthaltenen Transitsignalsequenz gewährleistet. Auch geeignet als Expressionskassette ist eine DNA-Sequenz, die für ein DOXS-Gen kodiert, das mit SEQ-ID No. 1 hybridisiert und das aus anderen
30 Organismen wie zum Beispiel E. coli (SEQ-ID No. 3) bzw. vorzugsweise aus anderen Pflanzen stammt.

Das nun vermehrt zur Verfügung stehende GGPP wird weiter in Richtung Tocopherole und Carotinoide umgesetzt.

35 Die effiziente Bildung von Carotinoiden ist essentiell für die Photosynthese, wobei sie neben den Chlorophyllen als "Lichtsammeler-Komplexe" zur besseren Ausnutzung der Photonenenergie dienen (Heldt, Pflanzenbiochemie. Spektrum Akademischer Verlag
40 Heidelberg Berlin Oxford, 1996). Zusätzlich erfüllen Carotinoide wichtige Schutzfunktionen gegen Sauerstoff-Radikale wie den Singulett-Sauerstoff, den sie wieder in den Grundzustand zurückführen können (Asada, 1994; Demming-Adams und Adams, Trends in Plant Sciences 1; 21-26(1996). Es wurde eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase defekte Arabidopsis thaliana Mutante
45 isoliert, die einen "Albino-Phänotyp" zeigt (Mandel et al, 1996).

Daraus ist abzuleiten, daß eine verringerte Menge an Carotinoiden in den Plastiden negative Auswirkungen auf die Pflanze hat.

Die Aufgabe wurden auch gelöst durch die Überexpression eines
5 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS)-Gens und eines
p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD)-Gens in den Pflanzen,
siehe Abbildung 1.

Um den Metabolit-Fluß aus dem Primärstoffwechsel in den Isopre-
10 noid-Stoffwechsel zu verstärken, wurde die Bildung von IPP als
allgemeines Ausgangssubstrat für alle plastidären Isoprenoide er-
höht. Zu diesem Zweck wurde in transgenen Tabak- und Rapspflanzen
die Aktivität der DOXS durch Überexpression der DOXS aus E.coli
erhöht. Dies kann durch Expression homologer oder anderer hetero-
15 loger Gene erreicht werden.

Das nun vermehrt zur Verfügung stehende D-1-Desoxy-Xylulose-
5-Phosphat wird weiter in Richtung Tocopherole und Carotinoide
umgesetzt.

20

Darüberhinaus verstärkt die Bildung von Homogentisinsäure den
Metabolitfluß weiter in Richtung von Phytylquinonen und damit
Tocopherol, siehe Abbildung 1. Homogentisinsäure wird gebildet
aus p-Hydroxyphenylpyruvat durch das Enzym p-Hydroxyphenylpyruvat
25 Dioxygenase (HPPD). cDNAs, die für dieses Enzym kodieren, wurden
aus verschiedenen Organismen wie beispielsweise aus Mikroorganis-
men, aus Pflanzen und aus dem Menschen beschrieben.

In Ausführungsbeispiel 11 wurde erstmals das HPPD-Gen aus Strep-
30 tomyces avermitilis (Denoya et al., J. Bacteriol. 176(1994),
5312-5319; SEQ-ID No. 5) zusammen mit der DOXS aus E.coli SEQ-ID
No. 3 in Pflanzen und pflanzlichen Plastiden überexprimiert.

Die Erhöhung der plastidären IPP Bildung führt zur verstärkten
35 Bildung aller plastidären Isoprenoide. Die erhöhte Bereitstellung
von Homogentisinsäure gewährleistet, daß genügend Substrat für
die Bildung von Tocopherolen in den Plastiden zur Verfügung
steht. Dieses nun vermehrt zur Verfügung stehende Homogentisat
kann in den transgenen Pflanzen seinerseits mit der durch die
40 Überexpression der DOXS erhöhten Menge an Phytyldiphosphat (PPP)
umgesetzt werden. PPP nimmt dabei eine Schlüsselstellung ein, da
es einerseits als Ausgangssubstrat für Chlorophylle und Phyllo-
quinone, andererseits für Tocopherole dient.

45 Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt durch Transforma-
tion der Pflanzen mit einem das DOXS-und das HPPD-Gen ent-
haltenden Konstrukt. Als Modellpflanzen für die Produktion von

Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und Carotinoiden wurden Tabak und Raps eingesetzt.

- Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung der DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5, die für eine DOXS bzw. HPPD oder deren funktionelle Äquivalente kodieren, zur Herstellung einer Pflanze mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt. Die Nukleinsäuresequenzen können dabei z.B. DNA- oder cDNA-Sequenzen sein. Zur Insertion in eine Expressionskassette geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine DOXS bzw. HPPD kodieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Tocopherol verleihen.
- 15 Die Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 20 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das DOXS- bzw. HPPD-Gen operativ verknüpft sind.
- 25 Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten DOXS- bzw. HPPD-DNA Sequenz und vorzugsweise einer zwischen Promotor und DOXS- bzw. HPPD DNA-Sequenz inserierten DNA, die für ein chloroplastenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, 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 30 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.
- 40 Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren DNA-Sequenz für ein DOXS- bzw. HPPD-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des 45 DOXS- bzw. HPPD-Gens in die Chloroplasten vom DOXS- bzw. HPPD-Teil enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären Transketolase (TK)

oder einem funktionellen Äquivalent dieses Transitpeptids (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase) abgeleitet ist.

- 5 Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für ein DOXS-Gen und ein HPPD-Gen kodiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren.
- 10 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer Expressionskassette enthaltend DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Transformation von Pflanzen, -zellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der
- 15 Verwendung die Erhöhung des Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und Carotinoid-Gehaltes der Pflanze.

- Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze
- 20 erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

- Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, trans-
- 25 formiert mit einer Expressionskassette enthaltend die Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen,
- 30 Roggen, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

- 35
- Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man Expressionskassetten enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen in
 - 40 eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzen einbringt.
 - Verwendung der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen
 - 45 zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vita-

min K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt durch Expression einer DOXS und einer HPPD DNA-Sequenz in Pflanzen.

Die Aufgabe wurden auch gelöst durch die Überexpression eines
5 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS)-Gens und eines Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR)-Gens in den Pflanzen, siehe Abbildung 1.

Um den Metabolit-Fluß aus dem Primärstoffwechsel in den Isoprenoid-Stoffwechsel zu verstärken, wurde die Bildung von IPP als
10 allgemeines Ausgangssubstrat für alle plastidären Isoprenoide erhöht. Zu diesem Zweck wurde in transgenen Tabak- und Raps-pflanzen die Aktivität der DOXS durch Überexpression der DOXS aus E.coli erhöht. Dies kann durch Expression homologer oder anderer
15 heterologer Gene erreicht werden.

Um das nun vermehrt zur Verfügung stehende GGPP in Richtung Tocopherole und Carotinoide umzusetzen, wird in einem weiteren erfindungswesentlichen Schritt zusätzlich die Aktivität des En-
20 zyms Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase durch Überexpression eines entsprechenden Gens gesteigert. Durch diese Maßnahme wird eine verstärkte Bildung von Phytylpyrophosphat durch verstärkte Umsetzung von Geranylgeranyl-Pyrophosphat zu Phytylpyrophosphat erreicht.

25 Hierzu wird beispielsweise das GGPPOR-Gen aus Arabidopsis thaliana (SEQ-ID No. 7) in transgenen Pflanzen verstärkt exprimiert. Um eine Plastidenlokalisation zu gewährleisten ist der Arabidopsis GGPPOR eine Transitsignalsequenz vorangestellt. Auch
30 geeignet als Expressionskassette ist eine DNA-Sequenz, die für ein GGPPOR-Gen codiert, das mit SEQ-ID No. 7 hybridisiert und das aus anderen Organismen bzw. aus anderen Pflanzen stammt.

In Ausführungsbeispiel 15 ist die Klonierung des GGPPOR-Gens aus
35 Arabidopsis thaliana beschrieben.

Die Erhöhung der plastidären 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat und Phytylpyrophosphat Bildung führt zur verstärkten Bildung aller plastidären Isoprenoide, so daß genügend Substrat für die Bildung
40 von Tocopherolen, Chlorophyllen, Vitamin K und Phylloquinonen in den Plastiden zur Verfügung steht.

Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt durch Transformation der Pflanzen mit einem das DOXS- und das GGPPOR-Gen ent-
45 haltenden Konstrukt. Als Modellpflanzen für die Produktion von

Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und Carotinoiden wurden Tabak und Raps eingesetzt.

- Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der DNA-Sequenzen
- 5 SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 7 die für eine DOXS bzw. GGPPOR oder deren funktionelle Äquivalente kodieren, zur Herstellung einer Pflanze mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt. Die Nukleinsäuresequenzen können dabei z.B. DNA- oder cDNA-Sequenzen sein. Zur Inser-
- 10 tion in eine Expressionskassette geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine DOXS bzw. GGPPOR kodieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Tocopherol verleihen.
- 15 Die Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am
- 20 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das DOXS- bzw. GGPPOR-Gen operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Termi-
- 25 nator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellular
- 30 laren Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).
- 35 Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-Transformationsvektor pBinAR-Hyg eingebaut werden. Abb. 2 zeigt die Tabaktransformationsvektoren pBinAR-Hyg mit 35S-Promotor (A) bzw. pBinAR-Hyg mit samenspezifischem Promotor Phaseolin
- 40 796 (B):
- HPT: Hygromycin-Phosphotransferase
 - OCS: Octopin-Synthase-Terminator
 - PNOS: Nopalinsynthase-Promotor
- 45 - außerdem sind solche Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die nur einmal den Vektor schneiden.

Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285 - 294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202).

Die Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen DOXS- bzw. GGPPOR-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer (EP-A 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können u.a. verwendet werden.

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Biosynthese von Tocopherol bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445 - 245).

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten DOXS- bzw. GGPPOR-DNA Sequenz und vorzugsweise einer zwischen Promotor und DOXS- bzw. GGPPOR-DNA-Sequenz inserierten DNA, die für ein chloroplastenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, 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 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.

13

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren DNA-Sequenz für ein DOXS- bzw. GGPPOR-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des DOXS- bzw. GGPPOR-Gens in die Chloroplasten vom DOXS- bzw. GGPPOR-Teil enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären Transketolase (TK) oder einem funktionellen Äquivalent dieses Transitpeptids (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase) abgeleitet ist.

Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für ein DOXS-Gen bzw. ein GGPPOR-Gen kodiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer Expressionskassette enthaltend DNA-Sequenzen SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 3, SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Transformation von Pflanzen, -zellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und Carotinoid-Gehaltes der Pflanze.

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer Expressionskassette enthaltend die Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

- Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man Expressionskassetten enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 3 und eine SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen

14

zen in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzen einbringt.

- 5 - Verwendung der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt durch Expression einer DOXS und einer GGPPOR DNA-Sequenz in Pflanzen.
- 10 Die Aufgabe wurden auch gelöst durch die Überexpression eines 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS)-Gens, eines p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD)-Gens und eines Geranylgeranylpyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR)-Gens in den Pflanzen, siehe Abbildung 1.
- 15 Um den Metabolit-Fluß aus dem Primärstoffwechsel in den Isoprenoid-Stoffwechsel zu verstärken, wurde die Bildung von IPP als allgemeines Ausgangssubstrat für alle plastidären Isoprenoide erhöht. Zu diesem Zweck wurde in transgenen Tabak- und Rapspflanzen
- 20 die Aktivität der DOXS durch Überexpression der DOXS aus E.coli erhöht. Dies kann auch durch Expression homologer oder anderer heterologer DOXS-Gene - wie zum Beispiel einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 - erreicht werden.
- 25 Das nun vermehrt zur Verfügung stehende D-1-Desoxy-Xylulose-5-Phosphat wird weiter in Richtung Geranylgeranylpyrophosphat umgesetzt.
- Um das vermehrt zur Verfügung stehende GGPP in Richtung Toco-
- 30 pherole und Carotinoide umzusetzen, wird in einem weiteren erfindungswesentlichen Schritt zusätzlich die Aktivität des Enzyms Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase durch Überexpression eines entsprechenden homologen oder heterologen Gens gesteigert. Durch diese Maßnahme wird eine verstärkte Bildung von
- 35 Phytylpyrophosphat durch verstärkte Umsetzung von Geranylgeranyl-Pyrophosphat zu Phytylpyrophosphat erreicht.
- Hierzu wird beispielsweise das GGPPOR-Gen aus Arabidopsis thaliana (SEQ-ID No. 7) in transgenen Pflanzen verstärkt exprimiert.
- 40 Um eine Plastidenlokalisation zu gewährleisten ist der Arabidopsis GGPPOR eine Transitsignalsequenz vorangestellt. Auch geeignet als Expressionskassette ist eine DNA-Sequenz, die für ein GGPPOR-Gen codiert, das mit SEQ-ID No. 7 hybridisiert und das aus anderen Organismen bzw. aus anderen Pflanzen stammt.

15

In Ausführungsbeispiel 15 ist die Klonierung des GGPPOR-Gens aus *Arabidopsis thaliana* beschrieben.

Um das vermehrt zur Verfügung stehende PPP in Richtung Toco-
5 pherole und Carotinoide umzusetzen, wird in einem weiteren
erfindungswesentlichen Schritt zusätzlich die Aktivität des En-
zyms p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) durch Über-
expression eines entsprechenden homologen oder heterologen Gens
gesteigert. Durch diese Maßnahme wird eine verstärkte Bildung von
10 Homogentisinsäure durch verstärkte Umsetzung von Hydroxyphenylpy-
ruvat in Homogentisinsäure erreicht.

cDNAs, die für dieses Enzym kodieren, wurden aus verschiedenen
Organismen wie beispielsweise aus Mikroorganismen, aus Pflanzen
15 und aus dem Menschen beschrieben.

In Ausführungsbeispiel 10 wird die Klonierung des HPPD-Gens aus
Streptomyces avermitilis beschrieben (Denoya et al., J. Bacte-
riol. 176(1994), 5312-5319; SEQ-ID No. 5). Um eine Plastidenloka-
20 lisation zu gewährleisten ist der HPPD aus *Streptomyces* eine
Transitsignalsequenz vorangestellt. Auch geeignet als Expres-
sionskassette ist eine DNA-Sequenz, die für ein HPPD-Gen codiert,
das mit SEQ-ID No. 5 hybridisiert und das aus anderen Organismen
bzw. aus Pflanzen stammt.

25

Die Erhöhung der plastidären D-1-Desoxy-Xylulose-5-Phosphat, der
Phytylpyrophosphat und der Homogentisinsäure Bildung führt zur
verstärkten Bildung aller plastidären Isoprenoide. Die erhöhte
Bereitstellung dieser Vorstufen gewährleistet, daß genügend Sub-
30 strat für die Bildung von Tocopherolen, Chlorophylle, Vitamin K
und Phylloquinone in den Plastiden zur Verfügung steht.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen erfolgt
durch Transformation der Pflanzen mit einem das DOXS-, das HPPD-
35 Gen und das GGPPOR-Gen enthaltenden Konstrukt (Beispiel 17). Als
Modellpflanzen für die Produktion von Tocopherolen, Vitamin K,
Chlorophyllen und Carotinoiden wurden Tabak und Raps eingesetzt.

Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der DNA-Sequenzen
40 SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3, SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7,
die für eine DOXS, eine HPPD und eine GGPPOR oder deren funktio-
nelle Äquivalente kodieren, zur Herstellung einer Pflanze mit er-
höhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-
Gehalt. Die Nukleinsäuresequenzen können dabei z.B. DNA- oder
45 cDNA-Sequenzen sein. Zur Insertion in eine Expressionskassette
geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die

16

für eine DOXS, eine HPPD und eine GGPPOR kodieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Tocopherol verleihen.

Die Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das DOXS-, das HPPD- bzw. das GGPPOR-Gen operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-Transformationsvektor pBinAR-Hyg eingebaut werden. Abb. 2 zeigt die Tabaktransformationsvektoren pBinAR-Hyg mit 35S-Promotor (A) bzw. pBinAR-Hyg mit samenspezifischem Promotor Phaseolin (B):

- HPT: Hygromycin-Phosphotransferase
 - OCS: Octopin-Synthase-Terminator
 - PNOS: Nopalinsynthase-Promotor
- außerdem sind solche Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die nur einmal den Vektor schneiden.

Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285 - 294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des

eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202).

Die Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren
5 Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen DOXS-,
HPPD-, bzw. GGPPOR-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeit-
punkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z.B. der
PRP1-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993),
361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor
10 (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer
(EP-A 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al.,
(1992) Plant J. 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzier-
barer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-in-
duzierbarer (WO 93/21334) Promotor können u.a. verwendet werden.

15 Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die
Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen
die Biosynthese von Tocopherol bzw. dessen Vorstufen stattfindet.
Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische
20 Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cyto-
solischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kar-
toffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445 - 245).

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion
25 eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten DOXS-, HPPD- bzw.
GGPPOR-DNA Sequenz und vorzugsweise einer zwischen Promotor und
DOXS-,HPPD- bzw. GGPPOR-DNA-Sequenz inserierten DNA, die für ein
chloroplastenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Po-
lyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und
30 Klonierungstechniken, 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) so-
wie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments
with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring
35 Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols
in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Inter-
science (1987) beschrieben sind.

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren DNA-
40 Sequenz für ein DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-Fusionsprotein kodiert,
wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die
Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die
Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Transloka-
tion des DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-Gens in die Chloroplasten vom
45 DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-Teil enzymatisch abgespalten werden.
Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plasti-
dären Transketolase (TK) oder einem funktionellen Äquivalent die-

ses Transitpeptids (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Unter-
einheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase) ab-
geleitet ist.

- 5 Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für
ein DOXS-Gen, ein HPPD-Gen und ein GGPPOR-Gen kodiert, in einen
Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, Agro-
bacterium tumefaciens zu transformieren.
- 10 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung
einer Expressionskassette enthaltend DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1
oder SEQ-ID No. 3, SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7 oder mit diesen
hybridisierende DNA-Sequenzen zur Transformation von Pflanzen,
-zellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der
15 Verwendung die Erhöhung des Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll-
und Carotinoid-Gehaltes der Pflanze.

- Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch
in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze er-
20 folgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie
deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Ge-
genstand der vorliegenden Erfindung.

- Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, trans-
25 formiert mit einer Expressionskassette enthaltend die Sequenz
SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3, SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7
oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen, sowie transgene
Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Beson-
ders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Ger-
30 ste, Weizen, Roggen, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zucker-
rübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, To-
mate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und
Weinspezies.

- 35 Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

- Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekenn-
zeichnet, daß man Expressionskassetten enthaltend eine DNA-
Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3, eine DNA-Sequenz
40 SEQ-ID No. 5 und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 7 oder mit die-
sen hybridisierende DNA-Sequenzen in eine Pflanzenzelle, in
Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflan-
zen einbringt.
- 45 - Verwendung der DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3,
SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende
DNA-Sequenzen zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Toco-

19

pherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt durch Expression einer DOXS-, einer HPPD- und einer GGPPOR-DNA-Sequenz in Pflanzen.

- 5 Zusätzliche Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher die Entwicklung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der DOXS.

- Diese Aufgabe wurde gelöst durch die Expression eines DOXS-Gens
10 aus Arabidopsis oder E. coli bzw. damit hybridisierende DNA-Sequenzen und anschließende Testung von Chemikalien auf Hemmung der DOXS-Enzymaktivität.

- Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt durch Transforma-
15 tion der Pflanzen mit einem das DOXS-Gen enthaltenden Konstrukt. Als Modellpflanzen für die Produktion von Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und Carotinoiden wurden Arabidopsis und Raps eingesetzt.

- 20 Die Klonierung des vollständigen DOXS-Gens aus Arabidopsis erfolgt über die Isolierung der für das DOXS-Gen spezifischen cDNA (SEQ-ID No. 1).

- Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der DNA-Sequenz SEQ
25 ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 die für eine DOXS oder deren funktionelles Äquivalent kodiert, zur Herstellung einer Pflanze mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt. Die Nukleinsäuresequenz kann dabei z.B. eine DNA- oder eine cDNA-Sequenz sein. Zur Insertion in eine Expressionskassette
30 geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine DOXS kodieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Tocopherol verleihen.

- Die Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in
35 der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere
40 regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das DOXS-Gen operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen
45 Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen

20

sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsver-
5 stärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987) 8693 -8711).

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-Transformationsvektor pBinAR-Hyg eingebaut werden. Abb.
10 zeigt die Tabaktransformationsvektoren pBinAR-Hyg mit 35S-Promotor (A) bzw. pBinAR-Hyg mit samenspezifischem Promotor Phaseolin 796 (B):

- HPT: Hygromycin-Phosphotransferase
 - 15 - OCS: Octopin-Synthase-Terminator
 - PNOS: Nopalin-Synthase-Promotor
 - außerdem sind solche Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die nur einmal den Vektor schneiden.
- 20 Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzen-
virus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor
25 aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285 - 294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989),
30 2195 - 2202).

Die Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen DOXS-
Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert wer-
35 den kann. Derartige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer (EP-A 388186), ein durch Tetracyclin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404), ein
40 durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können u.a. verwendet werden.

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die
45 Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Biosynthese von Tocopherol bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische

21

Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989) 2445 - 245).

- 5 Mit Hilfe eines samenspezifischen Promotors konnte ein Fremdprotein stabil bis zu einem Anteil von 0,67 % des gesamten löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen exprimiert werden (Fiedler und Conrad, Bio/Technology 10 (1995), 1090-1094). Die Expressionskassette kann daher beispielsweise
- 10 einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den Phaseolin-Promotor (US 5504200), den USP- (Baumlein, H. et al. Mol. Gen. Genet. (1991) 225 (3), 459 - 467) oder LEB4-Promotor (Fiedler und Conrad, 1995)), das LEB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal enthalten. Der Aufbau einer derartigen
- 15 Kasette ist in der Abbildung 2 schematisch beispielhaft dargestellt.

- Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten DOXS-DNA Sequenz
- 20 und vorzugsweise einer zwischen Promotor und DOXS-DNA-Sequenz inserierten DNA, die für ein chloroplastenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning:
- 25 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 Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing
- 30 Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

- Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in den Apoplasten, in Plastiden, in die Vakuole, in das Mitochondrium, in das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein Fehlen
- 35 entsprechender operativer Sequenzen einen Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, gewährleisten (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996), 285 - 423). Für die Menge der Proteinakkumulation in transgenen Pflanzen besonders förderlich erwiesen hat sich eine Lokalisation im ER (Schouten et al., Plant
- 40 Mol. Biol. 30 (1996), 781 - 792).

- Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren DNA-Sequenz für ein DOXS-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des
- 45 Polypeptides steuert. Besonders bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des DOXS-Gens in die Chloroplasten vom DOXS-Teil enzymatisch abge-

spalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären Transketolase (TK) oder einem funktionellen Äquivalent dieses Transitpeptids (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase) abgeleitet ist.

Die inserierte Nukleotid-Sequenz kodierend für eine DOXS kann synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen DOXS-Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen. Im allgemeinen werden synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons erzeugt, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden. Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine DNA-Sequenz die für ein DOXS-Gen codiert und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primerrepair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffül-

len von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

Von Bedeutung für den erfindungsgemäßen Erfolg kann u.a. das Anhängen des spezifischen ER-Retentionssignals SEKDEL sein (Schouten, A. et al. Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781 - 792), die durchschnittliche Expressionshöhe wird damit verdreifacht bis vervierfacht. Es können auch andere Retentionssignale, die natürlicherweise bei im ER lokalisierten pflanzlichen und tierischen Proteinen vorkommen, für den Aufbau der Kassette eingesetzt werden.

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

Eine Expressionskassette kann beispielsweise einen konstitutiven Promotor (bevorzugt den CaMV 35 S-Promotor), das LeB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und das ER-Retentionssignal enthalten. Als ER-Retentionssignal wird bevorzugt die Aminosäuresequenz KDEL (Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin) verwendet.

Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für ein DOXS-Gen kodiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Tabakpflanzen, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden. Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15 - 38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression eines DOXS-Gens enthalten.

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine DOXS kodierenden DNA wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise

Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71 - 119 (1993) beschrieben.

5

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a.

- 10 pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung

- 15 einer Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3; SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5; SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 7 bzw. eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7, oder mit diesen hybridisierende DNA-Se-
- 20 quenzen zur Transformation von Pflanzen, -zellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und Carotinoid-Gehaltes der Pflanze.

- 25 Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

30

Die Expressionskassette kann darüberhinaus auch zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen mit dem Ziel einer Erhöhung der Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll und/oder Carotinoid-Produktion eingesetzt werden.

35

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen

- 40 Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind 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, die Mikroinjektion
- 45 und der durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering

25

and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128 - 143 sowie in Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991) 205 - 225) beschrieben.

Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor
5 kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711).

Mit einer Expressionskassette transformierte Agrobakterien können
10 ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie Getreide, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, verwendet werden, z.B. indem
15 verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Funktionell äquivalente Sequenzen, die für ein DOXS-Gen kodieren, sind solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz
20 noch die gewünschten Funktionen besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den Kodon-Gebrauch einer Pflanze angepasste, künstliche Nukleotid-Sequenzen.

25

Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten für eine DOXS kodierende Sequenz, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigen. Mutationen umfassen Substitutionen,
30 Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation der DOXS-Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die weitere
35 Eingrenzung der darin enthaltenen kodierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren
40 Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abgeschwächt oder verstärkt ist.

Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschte Eigenschaft beispielsweise
45 der Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes in der Pflanze durch Überexpression des DOXS-Gens in Kulturpflanzen vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rücküber-

- setzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine, die DOXS Aktivität aufweisen oder durch *in vitro*-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind kodierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die
- 5 Wirtspflanze spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit pflanzengenetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.
- 10 Als weitere geeignete äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein pflanzliches DOXS-Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzyma-
- 15 tischer Aktivität sein oder eine antigene Polypeptidsequenz mit deren Hilfe ein Nachweis auf DOXS-Expression möglich ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative Proteinsequenz, wie z.B. ein Signal- oder Transitpeptid, das das DOXS-Protein an den gewünschten Wirkort leitet.
- 20 Gegenstand der Erfindung sind aber auch die erfindungsgemäß erzeugten Expressionsprodukte sowie Fusionsproteine aus einem Transitpeptid und einem Polypeptid mit DOXS-Aktivität.
- 25 Erhöhung des Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll und/oder Carotinoid-Gehaltes bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung dieser Verbindungen durch funktionelle Überexpression des DOXS-Gens in der Pflanze gegenüber der nicht gentechnisch
- 30 modifizierten Pflanze für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.

Der Biosyntheseort von Tocopherol ist im allgemeinen das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression des DOXS-Gens

35 sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Tocopherol-Biosynthese nicht auf das Blattgewebe beschränkt sein muß, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze - beispielsweise in fetthaltigen Samen - gewebespezifisch erfolgen kann.

- 40 Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen DOXS-Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.

Die Wirksamkeit der Expression des transgen exprimierten DOXS-

45 Gens kann beispielsweise *in vitro* durch Sproßmeristemvermehrung ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des DOXS-Gens und deren Auswirkung auf die Tocopherol-

Biosyntheseleistung an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen,
5 transformiert mit einer Expressionskassette enthaltend die
Sequenz SEQ-ID No.1 oder SEQ-ID No. 3; SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID
No. 3 und SEQ-No. 5; SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID
No. 7 bzw. eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und
SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7, oder mit diesen hybridisierende
10 DNA-Sequenzen, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermeh-
rungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei
transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Mais,
Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume,
Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und
15 die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies.

Pflanzen im Sinne der Erfindung sind mono- und dikotyle Pflanzen
oder Algen.

20 Um effiziente Hemmstoffe der DOXS finden zu können, ist es
notwendig, geeignete Testsysteme, mit denen Inhibitor-Enzym-
Bindungsstudien durchgeführt werden können, zur Verfügung zu
stellen. Hierzu wird beispielsweise die komplette cDNA-Sequenz
der DOXS aus Arabidopsis in einen Expressionsvektor (pQE, Qiagen)
25 kloniert und in *E. coli* überexprimiert.

Das mit Hilfe der Expressionskassette exprimierte DOXS-Protein
eignet sich besonders zur Auffindung von für die DOXS spezifi-
schen Hemmstoffen.

30 Dazu kann die DOXS beispielsweise in einem Enzymtest eingesetzt
werden, bei dem die Aktivität der DOXS in An- und Abwesenheit
des zu testenden Wirkstoffs ermittelt wird. Aus dem Vergleich
der beiden Aktivitätsbestimmungen läßt sich eine qualitative und
35 quantitative Aussage über das Hemmverhalten des zu testenden
Wirkstoffes machen. Methoden zur Aktivitätsbestimmung der DOXS
sind beschrieben (Putra et. al., Tetrahedron Letters 39 (1998),
23-26; Sprenger et al., PNAS 94 (1997), 12857-12862).

40 Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Testsystems kann eine Vielzahl
von chemischen Verbindungen schnell und einfach auf hemmende
Eigenschaften überprüft werden. Das Verfahren gestattet es,
reproduzierbar aus einer großen Anzahl von Substanzen gezielt
solche mit großer Wirkstärke auszuwählen, um mit diesen Substan-
45 zen anschließend weitere, dem Fachmann geläufige vertiefte
Prüfungen durchzuführen.

28

Durch Überexpression der für eine DOXS kodierenden Gensequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 in einer Pflanze kann prinzipiell eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der DOXS erreicht werden. Die derart hergestellten transgenen Pflanzen sind eben-
5 falls Gegenstand der Erfindung.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

- 10 - Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder eine mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzen einbringt.
- 15 - Verwendung einer Pflanze zur Herstellung pflanzlicher DOXS.
- 20 - Verwendung der Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder eine mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der DOXS durch verstärkte Expression einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder eine mit dieser hybridisierende DNA Sequenz.
- 25 - Verwendung der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder einer mit dieser hybridisierenden DNA-Sequenz zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt durch Expression einer DOXS DNA-Sequenz in Pflanzen.
- 30 - Verwendung der Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder eine mit dieser hybridisierenden DNA Sequenz zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der DOXS.

35

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

Allgemeine Klonierungsverfahren

40

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen
45 von DNA-Fragmenten, Transformation von E. coli Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring

Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt.

Die im folgenden verwendeten Bakterienstämme (*E. coli*, XL-I Blue) wurden von Stratagene bezogen. Der zur Pflanzentransformation verwendete Agrobakterienstamm (*Agrobacterium tumefaciens*, C58C1 mit dem Plasmid pGV2260 oder pGV3850kann) wurde von Deblaere et al. in (Nucl. Acids Res. 13 (1985) 4777) beschrieben. Alternativ können auch der Agrobakterienstamm LBA4404 (Clontech) oder andere geeignete Stämme eingesetzt werden. Zur Klonierung können die Vektoren pUC19 (Yanish-Perron, Gene 33 (1985), 103 - 119) pBluescript SK- (Stratagene), pGEM-T (Promega), pZero (Invitrogen), pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711 - 8720) und pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990), 221 - 230) benutzt werden.

Sequenzanalyse rekombinanter DNA

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463 - 5467).

Beispiel 1

25

Herstellung der Arabidopsis thaliana DOXS-Transformationskonstrukte

Das Arabidopsis thaliana DOXS Gen wurde wie in Mandel et al. (1996) beschrieben als vollständige cDNA in den Vektor pBluescript KS- (Stratagene) kloniert.

Zur Herstellung von Überexpressionskonstrukten wurde ein 2.3 kb Fragment (mit F-23-C bezeichnet) über die pBluescript KS- HincII (blunt-end) und SacI Schnittstellen isoliert. Diese Sequenz enthält die vollständige DOXS-cDNA inklusive Chloroplastentransitpeptid vom ATG-Startcodons bis zu einer EcoRI-Schnittstelle, die 80 bp stromabwärts des Stopcodons liegt. Dieses Fragment wurde über die Schnittstellen SmaI (blunt-end) und SacI in den pBIN 19 3X35S Vektor (Abbildung 3) kloniert (Bevan et al., 1980), der den 35S Promotor des Cauliflower Mosaik Virus (Franck et al., Cell 21(1), 285-294 (1980)) dreimal hintereinander angeordnet enthält.

Zur Herstellung von Antisense-Konstrukten wurde ein Bereich des 3'-Endes der cDNA (mit F-23-C Antisense bezeichnet) in den oben erwähnten pBIN19-3X35S-Vektor kloniert. Ein Teil des 5'-Bereichs der DOXS-cDNA in pBluescript KS- wurde über HincII und die DOXS-

30

interne BglIII Schnittstelle verdaut und das entstandene Fragment entfernt. (Abbildung 4). Die BglIII-Schnittstelle wurde über die Klenow-fill-in Reaktion (Klenow-Polymerase; Roche; nach Reaktion nach Herstellerprotokoll) aufgefüllt, so daß ein "blunt-end" entsteht. Die nun kompatiblen Enden (BglIII-"blunt-end" und HincIII wurden ligiert. Nun wurde der 3'-Bereich der DOXS-cDNA über KpnI und XbaI (beide Schnittstellen liegen im Polylinker von pBluescript KS-5'- und 3'- der DOXS-cDNA) in Antisense-Orientierung in den oben beschriebenen pBIN19-Vektor in Antisense-Orientierung kloniert.

Die Transformationen von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit den oben beschriebenen Konstrukten erfolgten mit *Agrobacterium tumefaciens* mit der Vakuum-Infiltrationsmethode (Bent et al., Science 265 (1994), 1856-1860). Mehrere unabhängige Transformanden wurden pro Konstrukt isoliert. Jeder Buchstabe (siehe Tabelle 1) bedeutet eine unabhängige transformierte Linie. Aus der daraus erhaltenen T1-Generation wurden Pflanzen auf Homo-oder Heterozygotie untersucht. Mehrere Pflanzen jeder Linie wurden gekreuzt, um eine Segregationsanalyse durchzuführen. Die Nummer in der Tabelle 1 entspricht der individuellen Pflanze, welche für weitere Analysen ausgewählt wurde. Es wurden sowohl homo- als auch heterozygote Linien erhalten. Die Segregationsanalyse der erhaltenen Linien ist in der folgenden Tabelle 1 dargestellt:

25

Tabelle 1. Segregationsanalyse der transgenen DOXS-T2-Pflanzen

	LINIEN	SEGREGATION
30	A9	75%
	A19	100%
	B11	75%
	B4	100%
35	C2	100%
	D3	75%
	D17	100%
	E9	75%
	E14	100%
40	F9	75%
	F14	100%

45

Beispiel 2

Isolierung genomischer DNA des Bakteriums *Escherichia coli* XL1 Blue

5

Eine Kultur von *Escherichia coli* XL1 Blue wurde in 300 ml Luria Broth-Medium für 12 Stunden bei 37°C angezogen. Aus dieser Kultur wurde die genomische DNA des Bakteriums isoliert, indem diese zunächst bei 5000 Umdrehungen in einer Sorvall RC50-Fuge pelletiert wurde. Anschliessend wurde das Pellet in 1/30 Volumen der Ursprungskultur Lysis-Puffer (25 mM EDTA, 0,5% SDS; 50 mM Tris HCl, pH 8,0) resuspendiert. Ein gleiches Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde zugegeben und bei 70 Grad 10 Minuten inkubiert. Anschliessend wurde in einer Heraeus Untertisch-15 Zentrifuge bei 3500 U 15 Minuten die wässrige Phase von der phenolischen getrennt. Der wässrige Überstand wurde mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 8 M Lithiumchlorid versetzt und die Nukleinsäuren bei Raumtemperatur für 10 Minuten gefällt. Das Pellet wurde anschliessend in 400 µl TE/RNase aufgenommen und bei 20 37 Grad für 10 Minuten inkubiert. Die Lösung wurde erneut mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt und der Überstand gefällt mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 8 M Lithiumchlorid. Das Pellet wurde anschliessend mit 80% Ethanol gewaschen und in 400 µl TE/RNase aufgenommen.

25

Beispiel 3

Isolierung der DOXS aus *E. coli*

30 Von der DNA-Sequenz der DOXS (Acc. Number AF035440) wurden für eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende eine BamHI und am 3'-Ende eine XbaI bzw. eine weitere BamHI Restriktions-schnittstelle angefügt wurde. Das Oligonukleotid am 5' Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATGGATCCATGAGTTTT-GATATTGCCAAATAC-3'

35 (Nukleotide 1-24 der DNA-Sequenz; kursiv geschrieben) beginnend mit dem ATG-Startcodon des Gens, das Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATTCTAGATTATGCCAGCCAGGCCTTG-3' bzw. 5'-ATG-GATCCTTATGCCAGCCAGGCCTTG-3' (Nukleotide 1845-1863 der revers komplementären DNA-Sequenz; kursiv geschrieben) beginnend mit dem

40 Stop-Kodon des Gens. Die PCR-Reaktion mit den beiden BamHI enthaltenden Oligonukleotiden wurde durchgeführt mit der Pfu-Polymerase (Stratagene GmbH, Heidelberg) nach Herstellerangaben. Als Template wurden 500 ng der genomischen DNA aus *E. coli* eingesetzt. Das PCR-Programm lautete:

45

5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 52°C, 2 min 72°C;

5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 48°C, 2 min 72°C;

32

25 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 44°C, 2 min 72°C

Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script 5 (Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung festgestellt. Das Fragment wurde BamHI aus dem PCR-Script-Vektor isoliert und in einen entsprechend geschnittenen Bin19-Vektor ligiert, der zusätzlich das Transitpeptid der Transketolase aus Kartoffel hinter dem CaMV 35S 10 Promotor enthält. Das Transitpeptid gewährleistet die plastidäre Lokalisierung. Die Konstrukte sind in Abbildung 5 und 6 dargestellt und die Fragmente haben die folgende Bedeutung:

Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus). Fragment B (259 bp) beinhaltet das Transitpeptid der Transketolase. Fragment E beinhaltet das Gen der DOXS. Fragment D (192 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination. 20

Die PCR-Reaktion mit den 5'-BamHI und 3'-XbaI enthaltenden Oligonukleotiden wurde durchgeführt mit Taq-Polymerase (Takara, Sosei Co., Ltd.) nach Herstellerangaben. Als Template wurden 500 ng der 25 genomischen DNA aus E. coli eingesetzt. Das PCR-Programm lautete:

5 Zyklen: 4 sec 94°C, 4 sec 50°C, 2 min 30°C

5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 46°C, 2 min 68°C

25 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 42°C, 2 min 68°C

30

Das Fragment wurde mit dem Gene-Clean-Kit gereinigt und in den Vektor pGemT (Promega GmbH, Mannheim) ligiert. Es wurde als BamHI/XbaI-Fragment in einen entsprechend geschnittenen pBin19AR-Vektor hinter den CaMV 35S Promotor kloniert. Die Sequenz wurde 35 durch Sequenzierung überprüft (SEQ-ID No. 3). Dabei wurden zwei nicht konservative Basenaustausche festgestellt, die im Vergleich zur veröffentlichten Sequenz zur Veränderung der Aminosäure 152 (Asparagin) in Valin und Aminosäure 330 (Cystein) in Tryptophan führen.

40

Beispiel 4

Nachweis erhöhter DOXS-RNA-Mengen in transgenen Pflanzen

45 Gesamt RNA aus 15 Tage alten Keimlingen verschiedener transgener Linien, welche das DOXS-Überexpressionskonstrukt besitzen, wurde nach der Methode von Logeman et al., Anal.Biochem. 163, 16-20

33

(1987) extrahiert, in einem 1.2% Agarosegel aufgetrennt, auf Filter transferiert und mit einem 2.1 kb langen DOXS-Fragment als Sonde hybridisiert (Abbildung 7).

5 Beispiel 5

Nachweis erhöhter DOXS-Protein-Mengen in transgenen Pflanzen

Gesamtprotein (Abbildung 8) aus 15 Tage alten Keimlingen

- 10 verschiedener, unabhängiger transgener Pflanzen, welche das DOXS-Überexpressionskonstrukt besitzen, wurde isoliert und mit einem polyklonalen Anti-DOXS-Antikörper (IgG) in einer Westernanalyse detektiert (Abbildung 9).

15 Beispiel 6

Messung des Carotinoid- und Chlorophyllgehalts

Die Bestimmung der Gesamtcarotinoid- und Chlorophyllmengen wurde
20 wie in Lichtenthaler und Wellburn (1983) beschrieben mit 100% Acetonextrakten durchgeführt. Die Ergebnisse der Mehrfachmessungen der transgenen Linien, welche das DOXS-Überexpressionskonstrukt besitzen, sind in der folgenden Tabelle 2 dargestellt.

25 Tabelle 2: Gesamtcarotinoid- und Chlorophyllgehalt der transgenen DOXS-Linien

	LINIE	% GESAMT CHLORO- PHYLLE	% GESAMT CAROTINOIDE
30	cla1 Mutante	5	5
	Wild Typ	100	100
	B-4	86	89
	B-11	84	90
35	C-2	98	107
	D-3	128	135
	D-17	136	149
	E-14	121	139
40	F-7	80	90
	F-14	85	107

Beispiel 7

Transformation von Raps

- 5 Die Herstellung der transgenen Rapspflanzen orientiert sich an einem Protokoll von Bade, JB und Damm, B (in Gene, Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38), in welchem auch die Zusammensetzung der verwendeten Medien angegeben sind. Die Trans-
10 formationen erfolgten mit dem Agrobacterium Stamm LBA4404 (Clontech). Als binäre Vektoren wurden die bereits oben beschriebenen pBIN19-Konstrukte mit der gesamten DOXS-cDNA verwendet. In diesen pBIN-Vektoren wurde die NOS-Terminatorsequenz durch die OCR-Terminatorsequenz ersetzt. Brassica napus Samen wurden mit 70 %
15 (v/v) Ethanol oberflächensteril gemacht, 10 min in 55°C H₂O gewaschen, in 1%iger Hypochlorit-Lösung (25 % v/v Teepol, 0,1 % v/v Twenn 20) für 20 min inkubiert und sechsmal mit sterilem H₂O für jeweils 20 min gewaschen. Die Samen wurden drei Tage auf Filterpapier getrocknet und 10-15 Samen in einem Glasskolben mit 15
20 ml Keimungsmedium zur Keimung gebracht. Von mehreren Keimlingen (ca. 10 cm groß) wurden die Wurzeln und Apices entfernt und die verbleibenden Hypokotyle in ca. 6 mm lange Stücke geschnitten. Die so gewonnenen ca. 600 Explante werden 30 min mit 50 ml Basalmedium gewaschen und in einen 300 ml Kolben überführt. Nach Zu-
25 gabe von 100 ml Kallus-Induktionsmedium wurden die Kulturen für 24 h bei 100 U/min inkubiert.

- Vom Agrobacterium-Stamm wurde eine Übernachtskultur bei 29°C in LB mit Kanamycin (20 mg/l) angesetzt, davon 2 ml in 50 ml LB ohne
30 Kanamycin für 4 h bei 29°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,5 inkubiert. Nach der Pelletierung der Kultur bei 2000 U/min für 25 min wurde das Zellpellet in 25 ml Basalmedium resuspendiert. Die Konzentration der Bakterien in der Lösung wurde durch Zugabe von weiterem Basalmedium auf eine OD₆₀₀ von 0.3 eingestellt.

- 35 Aus den Raps-Explanten wurde das Kallus-Induktionsmedium mit sterilen Pipetten entfernt, 50 ml Agrobacterium-Lösung hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 20 min inkubiert. Die Agrobacterien-Suspension wurde entfernt, die Raps-Explante für 1 min mit 50 ml
40 Kallus-Induktionsmedium gewaschen und anschließend 100 ml Kallus-Induktionsmedium hinzugefügt. Die Co-Kultivierung wurde für 24 h auf einem Rotationsschüttler bei 100 U/min durchgeführt. Die Co-Kultivierung wurde durch Wegnahme des Kallus-Induktionsmediums gestoppt und die Explante zweimal für jeweils 1 min mit 25 ml und
45 zweimal für 60 min mit jeweils 100 ml Waschmedium bei 100 U/min gewaschen. Das Waschmedium mit den Explanten wurde in 15 cm Petrischalen überführt und das Medium mit sterilen Pipetten ent-

35

fernt. Zur Regeneration wurden jeweils 20-30 Explanten in 90 mm Petrischalen überführt, welche 25 ml Sproß-Induktionsmedium mit Kanamycin enthielten. Die Petrischalen wurden mit 2 Lagen Leukoporphor verschlossen und bei 25°C und 2000 lux bei Photoperioden von 16/8 H inkubiert. Alle 12 Tage wurde die sich entwickelnden Kalli auf frische Petrischalen mit Sproß-Induktionsmedium überführt. Alle weiteren Schritte zur Regeneration ganzer Pflanzen wurde wie von Bade, J.B. und Damm, B. (in Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38) beschrieben durchgeführt.

Beispiel 8

Steigerung der Tocopherolbiosynthese in Raps

Die cDNA der DOXS (SEQ-ID No. 1) wurde mit einem CaMV35S-Promotor versehen und in Raps unter Verwendung des 35S-Promotors überexprimiert. Parallel dazu wurde der samenspezifische Promotor des Phaseolingenens verwendet, um den Tocopherolgehalt spezifisch im Rapssamen zu erhöhen. Mit den entsprechenden Konstrukten transformierte Rapspflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Anschließend wurde der α -Tocopherolgehalt der Gesamtpflanze bzw. der Samen der Pflanze bestimmt. In allen Fällen war die α -Tocopherolkonzentration im Vergleich zur nicht transformierten Pflanze erhöht.

Beispiel 9

Nachweis der Expression der DOXS aus E. coli in transgenen Tabakpflanzen

Von Pflanzen, die das Konstrukt pBinAR HPPD-DOXS enthielten, wurden Blattscheiben mit einem Durchmesser von 0,9 cm aus völlig entfalteten Blättern genommen und in flüssig Stickstoff eingefroren. Das Blattmaterial wurde in einem HEPES-KOH-Puffer, der Protease-Inhibitoren enthielt homogenisiert und aus dem Extrakt mit dem Protein-Assay von Bio-Rad nach Herstellerangaben die Proteinkonzentration bestimmt. 45 µg Protein wurden von jedem Extrakt mit einem Volumen Auftragspuffer (Laemmli, 1970) versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine auf einem 12,5 prozentigen SDS-PAGE Gel aufgetrennt. Danach wurden die Proteine mittels Semi-dry Elektroblobs auf Porablotmembran (Machery und Nagel) übertragen. Die Detektion des DOXS-Proteins erfolgte mittels eines Antikörpers gegen die E. coli DOXS aus Kaninchen. Die Farbreaktion basiert auf der Bindung eines sekundären Antikörpers und einer alkalischen Phosphatase, die NBT/BCIP zu einem Farbstoff umsetzt. Sekundärer Antikörper und alkalische

Phosphatase stammen von Pierce, die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Die Abbildung 10 zeigt den Nachweis des DOXS-Proteins in Blättern transgener Pflanzen. 1: Marker; 2: Pflanze 10; 3:62; 4: 63; 5: 69; 7:71; 8:112; 9:113; 10:116; 11:WT1; 12:WT2; 13:100ng rekombinantes Protein; 14:50 ng rekombinantes Protein; 15: 10 ng rekombinantes Protein.

10 Beispiel 10

Klonierung des Gens einer HPPD aus *Streptomyces avermitilis* U11864

15 Isolierung genomischer DNA des Bakteriums *Streptomyces avermitilis* U11864:

Eine Kultur von *Streptomyces avermitilis* U11864 wurde in 300 ml YEME-Medium (5 g Malz-Extrakt, 2 g Hefe-Extrakt, 2 g Glukose) für 96 h bei 28°C angezogen. Aus dieser Kultur wurde die genomische DNA des Bakteriums isoliert, indem diese zunächst bei 5000 U in einer Sorvall RC5C-Fuge pelletiert wurde. Anschliessend wurde das Pellet in 1/30 Volumen Lysis-Puffer (25 mM EDTA, 0,5 % SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) resuspendiert. Ein gleiches Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde zugegeben und bei 70°C 10 Minuten inkubiert. Anschliessend wurde in einer Heraeus Unter-tisch-Zentrifuge bei 3500 U 15 Minuten die wässrige Phase von der phenolischen getrennt. Der wässrige Überstand wurde mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 8 M Lithiumchlorid versetzt und die Nukleinsäuren bei Raumtemperatur für 10 Minuten gefällt. Das Pellet wurde anschliessend in 400 µl TE/RNase aufgenommen und bei 37 Grad für 10 Minuten inkubiert. Die Lösung wurde erneut mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt und der Überstand gefällt mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 8 M Lithiumchlorid. Das Pellet wurde anschließend mit 80% Ethanol gewaschen und in 400 µl TE/RNase aufgenommen.

Von der DNA-Sequenz der HPPD aus *Streptomyces avermitilis* (Denoya et al, 1994; Acc. Number U11864) wurden für eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende eine BamHI und am 3'-Ende eine XbaI Restriktionsschnittstelle angefügt worden war. Das Oligonukleotid am 5'-Ende umfasst die Sequenz 5'-GGATCCAGCGGA-CAAGCCAAC-3' (37 bis 55 Basen vom ATG in 5'-Richtung entfernt; kursiv geschrieben), das Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-TCTAGATTATGCCAGCCAGGCCTTG-3' (Nukleotide 1845-1863 der revers komplementären DNA-Sequenz; Kursiv geschrieben).

37

Die PCR-Reaktion wurde durchgeführt mit Pfu-Polymerase (Stratagene GmbH, Heidelberg) nach Herstellerangaben. Als Vorlage wurden 400 ng der genomischen DNA eingesetzt. Das PCR-Programm lautete:

- 5 5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 54°C, 2 min 72°C
- 5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 52°C, 2 min 72°C
- 25 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 50°C, 2 min 72°C

- Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden)
- 10 gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script (Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Dabei wurde festgestellt, daß das isolierte Gen für eine zusätzliche Aminosäure kodiert. Es enthält die drei Basen TAC (kodierend für Tyrosin),
 - 15 vor dem Nukleotid N429 der zitierten Sequenz (Denoya et al., 1994).

- Das Fragment wurde mit einem BamHI und XbaI Verdau aus dem Vektor isoliert und in einen entsprechend geschnittenen Bin19AR-Vektor
- 20 hinter den CaMV 35S Promotor ligiert, zur Expression des Gens im Zytosol. Aus dem gleichen PCR-Script-Vektor wurde das Gen als BamHI-Fragment isoliert und in einen entsprechend geschnittenen pBin19-Vektor ligiert, der hinter dem CaMV 35S Promotor noch zusätzlich das Transitpeptid der plastidären Transketolase aus
 - 25 Kartoffel enthält. Das Transitpeptid gewährleistet die plastidäre Lokalisierung. Die Konstrukte sind in Abbildung 11 und 12 dargestellt und die Fragmente haben folgende Bedeutung:

- Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus). Fragment B (259 bp) beinhaltet das Transitpeptid der Transketolase. Fragment C beinhaltet das Gen der HPPD. Fragment D (192 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen, J. et al., EMBO J. 3 (1984),
- 35 835-846) zur Transkriptionstermination.

Beispiel 11

- Herstellung von Konstrukten zur Pflanzentransformation mit DOXS
- 40 und HPPD-DNA-Sequenzen

- Zur Herstellung von Pflanzen, welche transgen für die DOXS und die HPPD sind, wurde ein binärer Vektor angefertigt, der beide Gensequenzen enthält (Abbildung 13). Die Gensequenzen der DOXS
- 45 und der HPPD wurden jeweils als BamHI-Fragmente wie in Beispiel 3 und 10 beschrieben kloniert. Der Vektor pBinAR-Hyg enthält den 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus und das Polyadenylierungs-

signal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination. Der pBinAR-Hyg Vektor vermittelt in Pflanzen Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin und ist so geeignet, Pflanzen mit Kanamycinresistenz zu superinfizieren.

Zur Klonierung der HPPD in Vektoren, welche zusätzlich noch eine andere cDNA enthalten, wurden für eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende und am 3'-Ende eine BamHI Restriktionsschnittstelle angefügt worden war. Das Oligonukleotid am 5'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-GGATCCTCCAGCGGACAAGCCAAC-3' (Nukleotide 37 bis 55 vom ATG in 5'-Richtung entfernt; Kursiv geschrieben), das Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATGGATC-CCGCGCCGCCCTACAGGTTG-3' (endend mit Basenpaar 1140 der kodierenden Sequenz, beginnend 8 Basenpaare 3' des TAG Stop-Codons; Kursiv geschrieben). Die PCR-Reaktion wurde durchgeführt mit Tli-Polymerase (Promega GmbH, Mannheim) nach Herstellerangaben. Als Template wurden 10 ng des Plasmids pBinAR-HPPD eingesetzt. Das PCR-Programm lautete:

20

5 Zyklen: 94°C 4 sec, 68°C 30 sec, 72°C 2 min

5 Zyklen: 94°C 4 sec, 64°C 30 sec, 72°C 2 min

25 Zyklen: 94°C 4 sec, 60°C 30 sec, 72°C 2 min

Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script (Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus dem Vektor PCR-Script wurde es als BamHI-Fragment ausgeschnitten und in einen entsprechend geschnittenen pBinAR-Vektor ligiert, der zusätzlich das Transitpeptid der Transketolase enthält, zur Einführung des Genprodukts in den Plastiden. Es entstand das Plasmid pBinAR-TP-HPPD (Abbildung 12).

Zur Klonierung wurde aus dem Plasmid pBinAR-TP-HPPD der 35S-Promotor, das Transketolase-Transitpeptid, das HPPD-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und den Terminator wurde jeweils eine HindIII-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den 5'-Bereich des Promotors (kursiv geschrieben) anlagert, lautet 5'-ATAAGCTTCATGGAGTCAAA-GATTCAAATAGA-3', die des Oligonukleotids, welches sich an die Terminationssequenz (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATAAGCTTGGACAATCAGTAAATTGAACGGAG-3'. Das erhaltene Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script

(Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft (SEQ-ID No. 5). Aus diesem PCR-Script-Vektor wurde es als HindIII-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor pBin19 (Bevan, 1984, Nucleic
5 Acids Res. 12, 8711-8721) übertragen.

Aus dem Plasmid pBinAR-TP-DOXS wurde der 35S-Promotor, das Transketolase-Transitpeptid, das DOXS-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al.,
10 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und die Terminatorsequenz wurde jeweils eine EcoRI-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den Promotor (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATGAATTCATGGAGTCAAAGATTCAAATAGA-3', die des
15 Oligonukleotids, welches sich an die Terminatorsequenz (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATGAATTCGGACAATCAGTAAATTGAA-CGGA-G-3'. Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script (Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit
20 der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft (SEQ-ID No. 3). Aus dem PCR-Script Vektor wurde es als EcoRI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor pBin19 (Bevan, 1984) übertragen.

Aus dem PCR-Script Vektor wurde es als XbaI-Fragment in den
25 entsprechend geschnittenen Vektor übertragen, der wie oben beschrieben bereits die Sequenz der HPPD enthielt. Es entstand das Konstrukt pBinAR-HPPD-DOXS (Abbildung 13), dessen Fragmente folgende Bedeutung haben:

30 Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437). Fragment B enthält das Transitpeptid der plastidären Transketolase. Fragment C enthält das Gen der HPPD. Fragment D enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al.,
35 1984) zur Transkriptionstermination. Fragment E enthält das Gen der DOXS.

Beispiel 12

40 Herstellung von transgenen Tabakpflanzen (Nicotiana tabacum L. cv. Samsun NN)

Für die Herstellung transgener Tabakpflanzen, die einen veränderten Prenyllipidgehalt aufweisen, wurden Tabakblattscheiben mit
45 Sequenzen der DOXS und der HPPD transformiert. Zur Transformation von Tabakpflanzen wurden 10 ml einer unter Selektion gewachsenen Übernachtskultur von Agrobacterium tumefaciens abzentrifugiert,

40

der Überstand verworfen und die Bakterien in gleichem Volumen Antibiotika-freien Mediums resuspendiert. In einer sterilen Petrischale wurden Blattscheiben steriler Pflanzen (Durchmesser ca. 1 cm) in dieser Bakteriensuspension gebadet. Anschließend
5 wurden die Blattscheiben in Petrischalen auf MS-Medium (Murashige und Skoog, *Physiol. Plant* (1962) 15, 473) mit 2% Saccharose und 0.8% Bacto-Agar ausgelegt. Nach 2-tägiger Inkubation im Dunkeln bei 25°C wurden sie auf MS-Medium mit 100mg/l Kanamycin, 500mg/l Claforan, 1mg/l Benzylaminopurin (BAP), 0.2mg/l Naphtylelessigsäure
10 (NAA), 1.6% Glukose und 0.8% Bacto-Agar übertragen und die Kultivierung (16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkelheit) fortgesetzt. Wachsende Sprosse wurden auf hormonfreies MS-Medium mit 2% Saccharose, 250mg/l Claforan und 0.8% Bacto-Agar überführt.

15 Beispiel 13

Herstellung von transgenen Rapspflanzen (*Brassica napus*)

Die Herstellung der transgenen Rapspflanzen, die einen veränderten Prenyllipidgehalt aufweisen, orientierte sich an einem Protokoll von Bade, J.B. und Damm, B. (in *Gene Transfer to Plants*, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38), in welchem auch die Zusammensetzungen der verwendeten Medien und Puffer angegeben sind.

25

Die Transformationen erfolgten mit dem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm LBA4404 (Clontech GmbH, Heidelberg). Als binäre Vektoren wurden die bereits oben beschriebenen binären Konstrukte mit den gesamten cDNAs der DOXS und der HPPD verwendet. In allen hier
30 verwendeten binären Vektoren wurde die NOS-Terminatorsequenz durch das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination ersetzt. *Brassica napus* Samen wurden mit 70% (v/v) Ethanol oberflächensteril gemacht, 10 min bei 55°C in H₂O gewaschen, in
35 1%iger Hypochlorit-Lösung (25% v/v Teepol, 0,1% v/v Tween 20) für 20 min inkubiert und sechsmal mit sterilem H₂O für jeweils 20 min gewaschen. Die Samen wurden drei Tage auf Filterpapier getrocknet und 10-15 Samen in einem Glasskolben mit 15 ml Keimungsmedium zur Keimung gebracht. Von mehreren Keimlingen (ca. 10 cm groß) wurden
40 die Wurzeln und Apices entfernt und die verbleibenden Hypokotyle in ca. 6 mm lange Stücke geschnitten. Die so gewonnenen ca. 600 Explante werden 30 min mit 50 ml Basalmedium gewaschen und in einen 300 ml Kolben überführt. Nach Zugabe von 100 ml Kallus-Induktionsmedium wurden die Kulturen für 24 h bei 100 U/min
45 inkubiert.

41

- Vom Agrobacterium-Stamm wurde eine Übernachtskultur bei 29°C in Luria Broth-Medium mit Kanamycin (20 mg/l) angesetzt, davon 2 ml in 50 ml Luria Broth-Medium ohne Kanamycin für 4 h bei 29°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,5 inkubiert. Nach der Pelletierung der
- 5 Kultur bei 2000 U/min für 25 min wurde das Zellpellet in 25 ml Basalmedium resuspendiert. Die Konzentration der Bakterien in der Lösung wurde durch Zugabe von weiterem Basalmedium auf eine OD₆₀₀ von 0.3 eingestellt.
- 10 Aus den Raps-Explanten wurde das Kallus-Induktionsmedium mit sterilen Pipetten entfernt, 50 ml Agrobacterium-Lösung hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 20 min inkubiert. Die Agrobacterien-Suspension wurde entfernt, die Raps-Explanze für 1 min mit 50 ml Kallus-Induktionsmedium gewaschen und anschließend 100 ml Kallus-
- 15 Induktionsmedium hinzugefügt. Die Co-Kultivierung wurde für 24 h auf einem Rotationsschüttler bei 100 U/min durchgeführt. Die Co-Kultivierung wurde durch Wegnahme des Kallus-Induktionsmediums gestoppt und die Explante zweimal für jeweils 1 min mit 25 ml und zweimal für 60 min mit jeweils 100 ml Waschmedium bei 100 U/min
- 20 gewaschen. Das Waschmedium mit den Explanten wurde in 15 cm Petrischalen überführt und das Medium mit sterilen Pipetten entfernt.

- Zur Regeneration wurden jeweils 20-30 Explante in 90 mm Petri-
- 25 schalen überführt, welche 25 ml Sproß-Induktionsmedium mit Kanamycin enthielten. Die Petrischalen wurden mit 2 Lagen Leukopor verschlossen und bei 25°C und 2000 lux bei Photoperioden von 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit inkubiert. Alle 12 Tage wurden die sich entwickelnden Kalli auf frische Petrischalen mit Sproß-
- 30 Induktionsmedium überführt. Alle weiteren Schritte zur Regeneration ganzer Pflanzen wurde wie von Bade, J.B. und Damm, B. (in Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38) beschrieben durchgeführt.

35

Beispiel 14

Steigerung der Tocopherolbiosynthese in Raps

- 40 Die cDNA der DOXS (SEQ-ID No. 3) und der HPPD (SEQ-ID No. 5) wurde mit einem CaMV35S-Promotor versehen und in Raps unter Verwendung des 35S-Promotors überexprimiert. Parallel dazu wurde der samenspezifische Promotor des Phaseolingenens verwendet, um den Tocopherolgehalt spezifisch im Rapssamen zu erhöhen. Mit den
- 45 entsprechenden Konstrukten transformierte Rapspflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Anschließend wurde der α -Tocopherolgehalt der Gesamtpflanze bzw. der Samen der Pflanze bestimmt. In allen

Fällen war die α -Tocopherolkonzentration im Vergleich zur nicht transformierten Pflanze erhöht.

Beispiel 15

5

Klonierung des Gens einer GGPPOR aus *Arabidopsis thaliana*

Isolierung von Gesamt-RNA aus voll entfalteten Blättern von *Arabidopsis thaliana*:

10

Voll entfaltete Blätter von *Arabidopsis thaliana* wurden geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Material wurde anschließend im Mörser pulverisiert und in Z6-Puffer (8 M Guanidinium-hydrochlorid, 20 mM MES, 20 mM EDTA pH 7,0) aufgenommen. Die

15

Suspension wurde in Reaktionsgefäße überführt und mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1 ausgeschüttelt. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 15000 U/min wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1/20 Volumen 1N Essigsäure und 0,7 Volumen Ethanol (absolut) die RNA gefällt.

20

Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet zunächst mit 3M Natriumacetatlösung gewaschen und nach einer weiteren Zentrifugation in 70% Ethanol. Anschließend wurde das Pellet in DEPC-Wasser gelöst und die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

25

Herstellung von cDNA aus gesamt RNA voll entfalteter Blätter von *A. thaliana*:

20 μ g Gesamt-RNA wurden zunächst mit 3,3 μ l 3M Natriumacetat-lösung und 2 μ l 1M Magnesiumsulfatlösung versetzt und auf 100 μ l

30

Endvolumen mit DEPC Wasser aufgefüllt. Dazu wurde 1 μ l RNase freie DNase (Boehringer Mannheim) gegeben und 45 min bei 37°C inkubiert. Nach Entfernen des Enzyms durch Ausschütteln mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol wurde die RNA mit Ethanol gefällt und das Pellet in 100 μ l DEPC Wasser aufgenommen. 2,5 μ g RNA aus

35

dieser Lösung wurden mittels eines cDNA-Kits (Gibco, Life Technologies) in cDNA umgeschrieben.

Von der DNA-Sequenz der Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (Keller et al, Eur.J.Biochem.(1998)251(1-2),413-417); Accession Number Y14044) wurden für eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende eine BamHI und am 3'-Ende eine Sali Restriktionsschnittstelle angefügt worden war. Das Oligonukleotid am 5'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATGGATCCATGGCGACGCGTTACTC-3' beginnend mit dem ersten Kodon der cDNA (kursiv gedruckt), das

45

Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATGTCGACGTGATGA-

43

TAGATTACTAACAGAC-3' beginnend mit dem Basenpaar 1494 der cDNA Sequenz (kursiv gedruckt).

Die PCR-Reaktion wurde durchgeführt mit Pfu-Polymerase von Stratagene GmbH, Heidelberg nach Herstellerangaben. Als Template wurde 1/8 Volumen der cDNA eingesetzt (entspricht 0,3 µg RNA). Das PCR-Programm lautete:

- 5 Zyklen: 94°C für 4 sec, 48°C für 30 sec, 72°C für 2 min
10 5 Zyklen: 94°C für 4 sec, 46°C für 30 sec, 72°C für 2 min
25 Zyklen: 94°C für 4 sec, 44°C für 30 sec, 72°C für 2 min

Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit des Fragments wurde durch Sequenzierung überprüft (SEQ ID No. 7). Mittels der durch die Primer an die Sequenz angefügten Restriktionsschnittstellen wurde das Gen als BamHI/SalI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor BinAR-Hyg kloniert. Dieser enthält den 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835-846) zur Transkriptionstermination. Das Plasmid vermittelt in Pflanzen Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin und ist so geeignet, Pflanzen mit Kanamycinresistenz zu superinfizieren. Da das Plastidentransitpeptid der GGPPOR mitkloniert wurde, sollte das Protein in transgenen Pflanzen in die Plastiden transportiert werden. Das Konstrukt ist in Abbildung 14 dargestellt. Die Fragmente haben die folgende Bedeutung:

- 30 Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus). Fragment D enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur
35 Transkriptionstermination. Fragment F enthält das Gen der GGPPOR inklusive der intrinsischen Plastidentransitsequenz.

Beispiel 16

- 40 Herstellung von Konstrukten zur Pflanzentransformation mit DOXS und GGPPOR Sequenzen

Zur Herstellung von Pflanzen, welche transgen für die DOXS und die GGPPOR sind wurde ein binärer Vektor angefertigt, der beide
45 Gensequenzen enthält (Abbildung 15). Das GGPPOR-Gen mit der intrinsischen Plastidenlokalisationssequenz wurde (wie in Beispiel 15 beschrieben) als BamHI/SalI-Fragment in den entsprechend

geschnittenen Vektor pBinAR-Hyg kloniert. Das Gen der DOXS wurde als BamHI-Fragment wie in Beispiel 3 beschrieben kloniert. Der Vektor pBinAR-Hyg enthält den 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des

5 Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination. Dieses Plasmid vermittelt in Pflanzen Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin und ist so geeignet, Pflanzen mit Kanamycinresistenz zu superinfizieren.

- 10 Aus dem Plasmid pBinAR-TP-DOXS wurde der 35S-Promotor, das Transketolase-Transitpeptid, das DOXS-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und die Terminatorsequenz wurde
- 15 jeweils eine EcoRI-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den Promotor (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATGAATTCATGGAGTCAAAGATTCAAATAGA-3', die des Oligonukleotids, welches sich an die Terminatorsequenz (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATGAATTCGGACAATCAGTAAATTGAACGGA-
- 20 G-3'. Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus dem PCR-Script Vektor wurde es als EcoRI-Fragment in den entsprechend
- 25 geschnittenen Vektor pBin19 (Bevan, Nucleic Acids Res.12(1984), 8711-8721) übertragen.

- Aus dem Plasmid pBinARHyg-GGPPOR wurde der 35S-Promotor, das GGPPOR-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA
- 30 des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und den Terminator wurde jeweils eine XbaI-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den Promotor (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATTCTAGACATG-
- 35 GAGTCAAA-GATTCAAATAGA-3', die des Oligonukleotids, welches sich an die Terminatorsequenz (Kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATTCTAGAGGACAA-TCAGTAAATTGAACGGAG-3'. Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH,
- 40 Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus dem PCR-Script Vektor wurde es als XbaI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor übertragen, welcher bereits wie oben beschrieben die Sequenz der DOXS enthielt. Es entstand das Konstrukt pBinAR-DOXS-GGPPOR (Abbildung
- 45 15), dessen Fragmente folgende Bedeutung haben:

45

Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus). Fragment B enthält das Transitpeptid der plastidären Transketolase. Fragment E enthält das Gen der DOXS. Fragment D

- 5 enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination. Fragment F enthält das Gen der GGPPOR inklusive der intrinsischen Plastidentransitsequenz.

10 Beispiel 17

Herstellung von Konstrukten zur Pflanzentransformation mit DOXS-, GGPPOR- und HPPD-DNA-Sequenzen

- 15 Zur Herstellung von Pflanzen, welche transgen für die DOXS, die GGPPOR und die HPPD sind, wurde ein binärer Vektor angefertigt, der alle drei Gensequenzen enthält (Abbildung 16). Das GGPPOR-Gen war mit der intrinsischen Plastidenlokalisationssequenz versehen (wie in Beispiel 15 beschrieben). Der verwendete pBinAR-Hyg Vek-
20 tor vermittelt in Pflanzen Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin und ist so geeignet, Pflanzen mit Kanamycinresistenz zu superinfizieren.

- Zur Klonierung der HPPD in Vektoren, welche zusätzlich noch eine
25 andere cDNA enthalten, wurden für eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende und am 3'-Ende eine BamHI Restriktionschnittstelle angefügt worden war. Das Oligonukleotid am 5'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-GGATCCTCCAGCGGACAAGCCAAC-3' (Nukleotide 37 bis 55 vom ATG in 5'-Richtung entfernt; Kursiv geschrieben), das
30 Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATGGATC-CCGCGCCGCTACAGGTTG-3' (endend mit Basenpaar 1140 der kodierenden Sequenz, beginnend 8 Basenpaare 3' des TAG Stopp-Codons; Kursiv geschrieben). Die PCR-Reaktion wurde durchgeführt mit Tli-Polymerase von Promega GmbH, Mannheim nach Herstellerangaben. Als
35 Template wurden 10 ng des Plasmids pBinAR-HPPD eingesetzt. Das PCR-Programm lautete:

5 Zyklen: 94°C 4 sec, 68°C 30 sec, 72°C 2 min

5 Zyklen: 94°C 4 sec, 64°C 30 sec, 72°C 2 min

- 40 25 Zyklen: 94°C 4 sec, 60°C 30 sec, 72°C 2 min

- Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz
45 wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus dem Vektor PCR-Script wurde es als BamHI-Fragment ausgeschnitten und in einen entsprechend geschnittenen pBinAR-Vektor ligiert, der zusätzlich das

46

Transitpeptid der Transketolase enthält, zur Einführung des Genprodukts in den Plastiden. Es entstand das Plasmid pBinAR-TP-p-HPPD.

- 5 Zur Klonierung wurde aus dem Plasmid pBinAR-TP-HPPD der 35S-Promotor, das Transketolase-Transitpeptid, das p-HPPD-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al. 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und
10 den Terminator wurde jeweils eine HindIII-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den 5'-Bereich des Promotors anlagert (kursiv geschrieben) lautet 5'-ATAAGCTT-CATGGAGTCAAA-GATTCAAATAGA-3', die des Oligonukleotids, welches sich an die Terminationssequenz (kursiv geschrieben) anlagert
15 lautet 5'-ATAAGCTTGGAC-AATCAGTAAATTGAACGGAG-3'. Das erhaltene Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus diesem PCR-Script-Vektor
20 wurde es als HindIII-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor pBin19 (Bevan, 1984, Nucleic Acids Res. 12, 8711-8721) übertragen.

- Aus dem Plasmid pBinAR-TP-DOXS wurde der 35S-Promotor, das Transketolase-Transitpeptid, das DOXS-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und die Terminatorsequenz wurde jeweils eine EcoRI-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den Promotor (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATGAATTCATGGAGTCAAAGATTCAAATAGA-3', die des Oligonukleotids, welches sich an die Terminatorsequenz (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATGAATTCGGACAATCAGTAAATTGAACGGAG-3'. Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH,
35 Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus dem PCR-Script Vektor wurde es als EcoRI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor übertragen, welcher bereits wie oben beschrieben die Sequenz der HPPD enthielt.
40

- Aus dem Plasmid pBinARHyg-GGPPOR wurde der 35S-Promotor, das GGPPOR-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und den Terminator wurde jeweils eine XbaI-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den
45

47

Promotor (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATTCTAGACATG-GAGTCAAA-GATTCAAATAGA-3', die des Oligonukleotids, welches sich an die Terminatorsequenz (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATTCTAGAGGACAA-TCAGTAAATTGAACGGAG-3'. Das Fragment wurde
5 mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus dem PCR-Script Vektor wurde es als XbaI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor übertra-
10 gen, welcher bereits wie oben beschrieben die Sequenzen der HPPD und der DOXS enthielt. Es entstand das Konstrukt pBinAR-DOXS-GGPPOR-HPPD (Abbildung 16), dessen Fragmente folgende Bedeutung haben:

15 Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus). Fragment B enthält das Transitpeptid der plastidären Transketolase. Fragment C enthält das Gen der HPPD. Fragment D enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids
20 pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination. Fragment E enthält das Gen der DOXS. Fragment F enthält das Gen der GGPPOR inklusive der intrinsischen Plastidentransitsequenz.

Beispiel 18

25

Steigerung der Tocopherolbiosynthese in Raps

Die cDNA der DOXS (SEQ-ID No. 3) und der GGPPOR (SEQ-ID No. 7) wurde mit einem CaMV35S-Promotor versehen und in Raps unter
30 Verwendung des 35S-Promotors überexprimiert. Parallel dazu wurde der samenspezifische Promotor des Phaseolingenos verwendet, um den Tocopherolgehalt spezifisch im Rapssamen zu erhöhen. Mit den entsprechenden Konstrukten transformierte Rapspflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Anschließend wurde der α -Tocopherolgehalt
35 der Gesamtpflanze bzw. der Samen der Pflanze bestimmt. In allen Fällen war die α -Tocopherolkonzentration im Vergleich zur nicht transformierten Pflanze erhöht.

Beispiel 19

40

Steigerung der Tocopherolbiosynthese in Raps

Die cDNA der DOXS (SEQ-ID No. 3), der HPPD (SEQ-ID No. 5) und der GGPPOR (SEQ-ID No. 7) wurde mit einem CaMV35S-Promotor versehen
45 und in Raps unter Verwendung des 35S-Promotors überexprimiert. Parallel dazu wurde der samenspezifische Promotor des Phaseolingenos verwendet, um den Tocopherolgehalt spezifisch im Rapssamen

zu erhöhen. Mit den entsprechenden Konstrukten transformierte
Rapspflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Anschließend wurde
der α -Tocopherolgehalt der Gesamtpflanze bzw. der Samen der
Pflanze bestimmt. In allen Fällen war die α -Tocopherolkonzentra-
5 tion im Vergleich zur nicht transformierten Pflanze erhöht.

10

15

20

25

30

35

40

45

Patentansprüche

1. Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt.
2. Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder einer mit dieser hybridisierenden DNA-Sequenz kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden.
3. Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) und codierend für eine p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt.
4. Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) und eine p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden.
5. Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) und codierend für eine Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt.
6. Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und einer DNA-Sequenz SEQ ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) und eine Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden.
7. Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS), codierend für eine Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) und codierend für eine Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR) zur Her-

stellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt.

- 5 8. Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3, einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 5 und einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS), eine Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) und eine Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR) zur Herstellung von
10 Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden.
- 15 9. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhte Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder eine mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz in Pflanzen exprimiert wird.
- 20 10. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen in Pflanzen exprimiert werden.
- 25 11. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 7 oder mit
30 diesen hybridisierende DNA-Sequenzen in Pflanzen exprimiert werden.
- 35 12. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, dadurch gekennzeichnet, daß DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3, SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen in Pflanzen exprimiert werden.
- 40 13. Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend einen Promotor und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzenzellen einbringt.
- 45 14. Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend einen Promotor und DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und

SEQ-ID No. 5 in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzenzellen einbringt.

15. Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend einen Promotor und DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 7 in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzenzellen einbringt.
16. Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend einen Promotor und DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3, SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7 in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzenzellen einbringt.
17. Verfahren zur Transformation von Pflanzen gemäß Anspruch 13-16, dadurch gekennzeichnet, daß die Transformation mit Hilfe des Stammes *Agrobacterium tumefaciens*, der Elektroporation oder der particle bombardment Methode erfolgt.
18. Pflanze mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll und/oder Carotinoid-Gehalt enthaltend eine Expressionskassette gemäß Anspruch 13-16.
19. Pflanze nach Anspruch, ausgewählt aus der Gruppe Soja, Canola, Gerste, Hafer, Weizen, Raps, Mais oder Sonnenblume.
20. Verwendung der SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der DOXS.
21. Testsystem basierend auf der Expression einer Expressionskassette gemäß Anspruch 13 zur Identifizierung von Inhibitoren der DOXS.
22. Verwendung einer Pflanze enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder eine mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz zur Herstellung pflanzlicher und bakterieller DOXS.

Abbildung 1

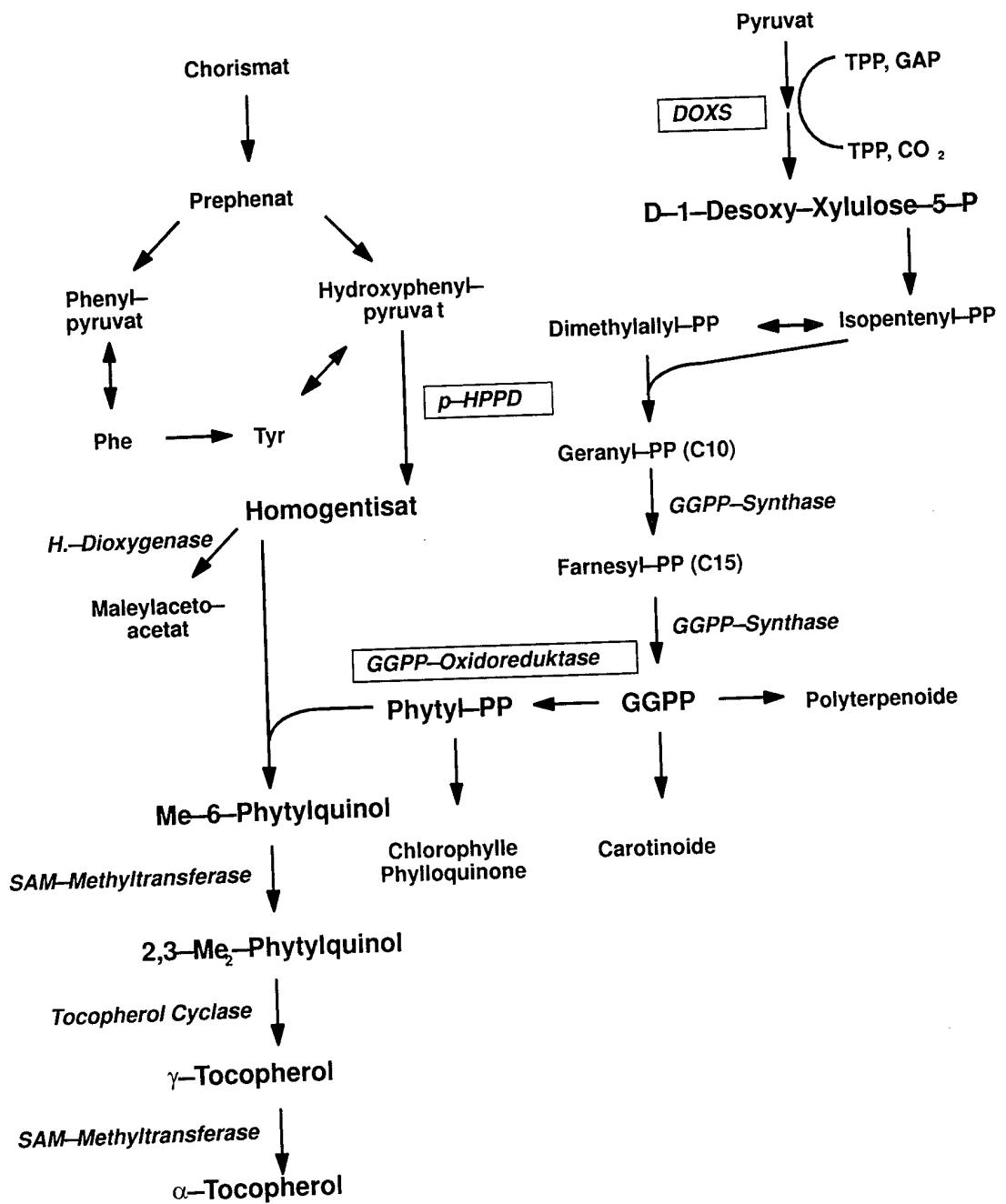


Abbildung 2

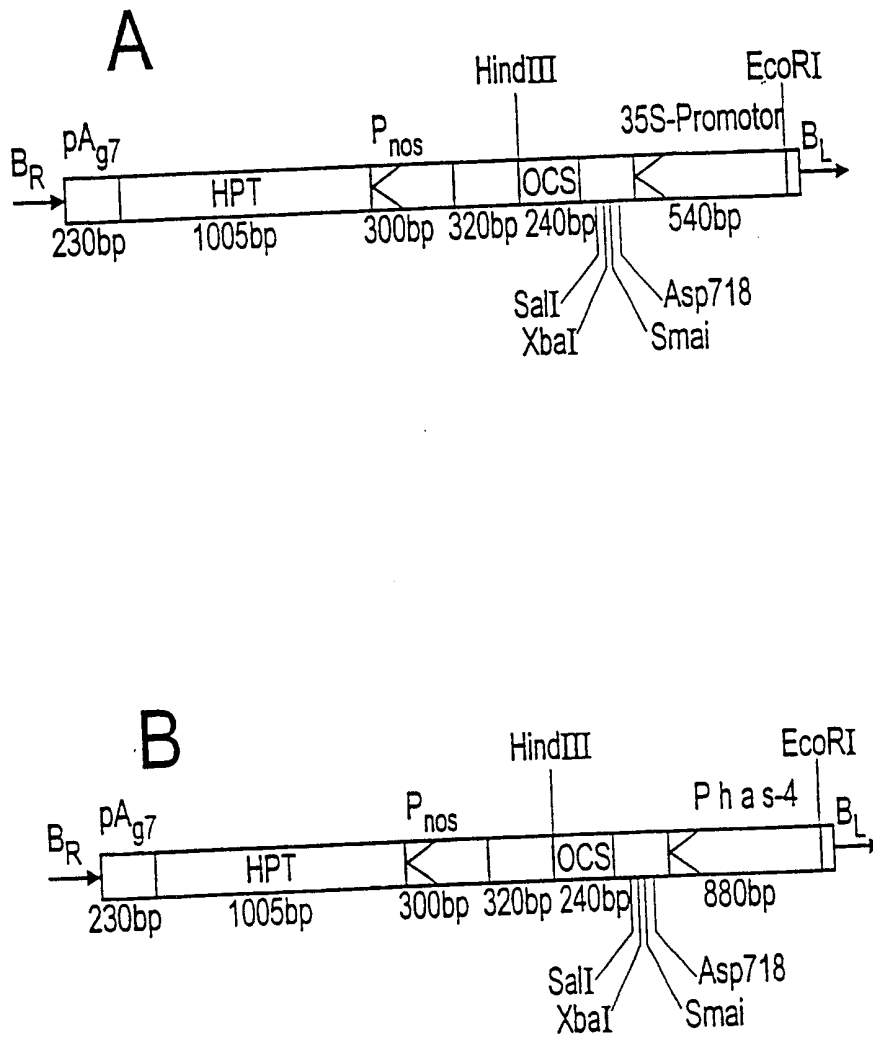
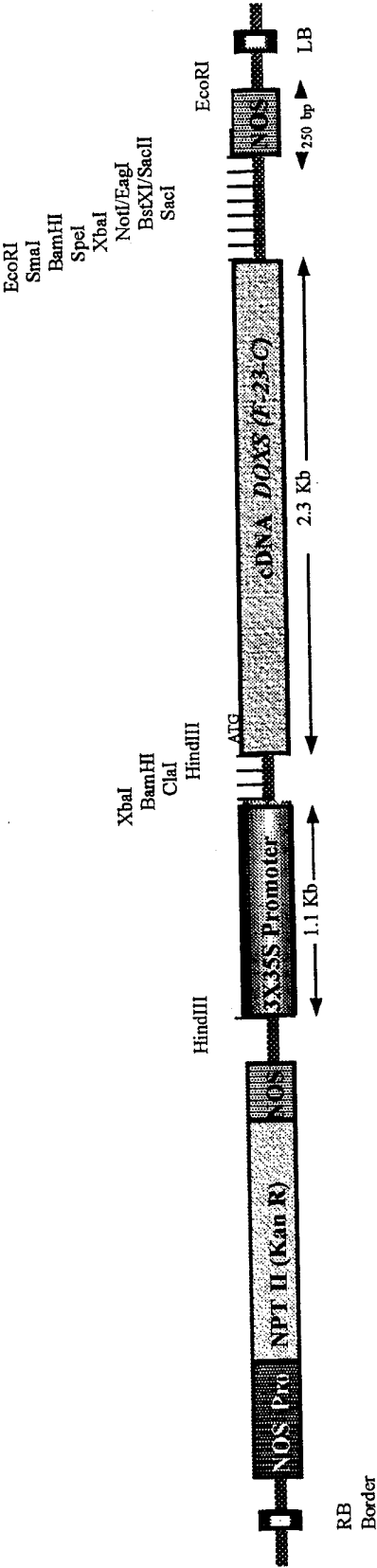


Abbildung 3

pBin19-3X 35S-F-23-C (Sense)



pBin19-3X 35S-DOXS (Antisense)

Abbildung 4

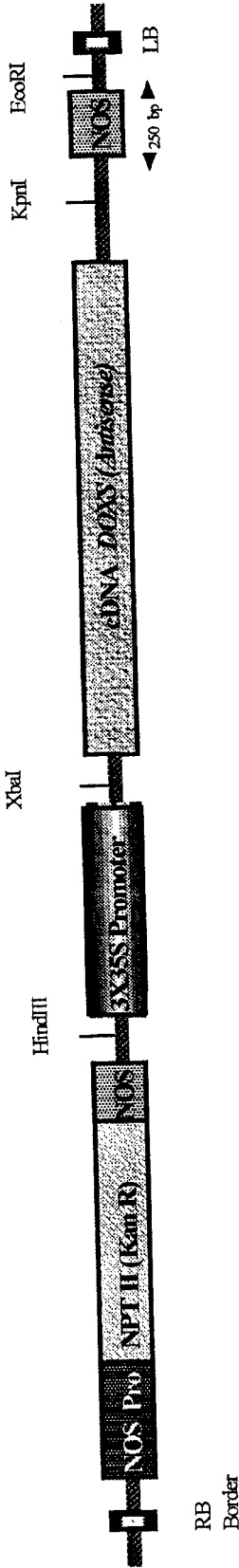
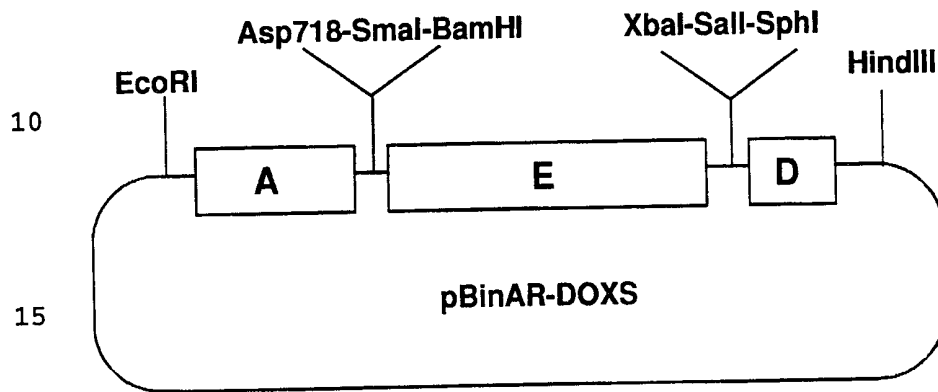


Abbildung 5

Binärer Vektor zur Überexpression des DOXS-Gens aus E.coli im
5 Zytosol transgener Pflanzen



20 Abbildung 6

Binärer Vektor zur Überexpression des DOXS-Gens aus E. coli in
Plastiden transgener Pflanzen.

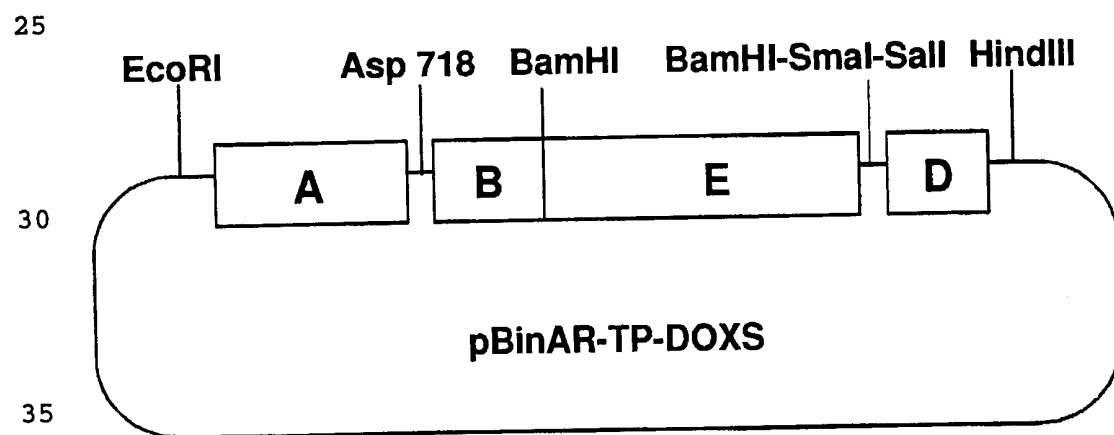


Abbildung 7: RNA Expressionslevel des DOXS-Gens

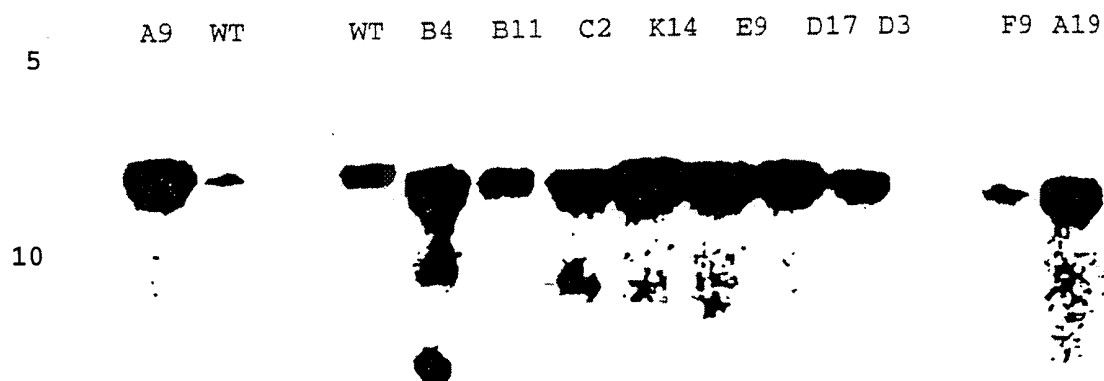


Abbildung 8: Protein-Mengen in transgenen Pflanzen

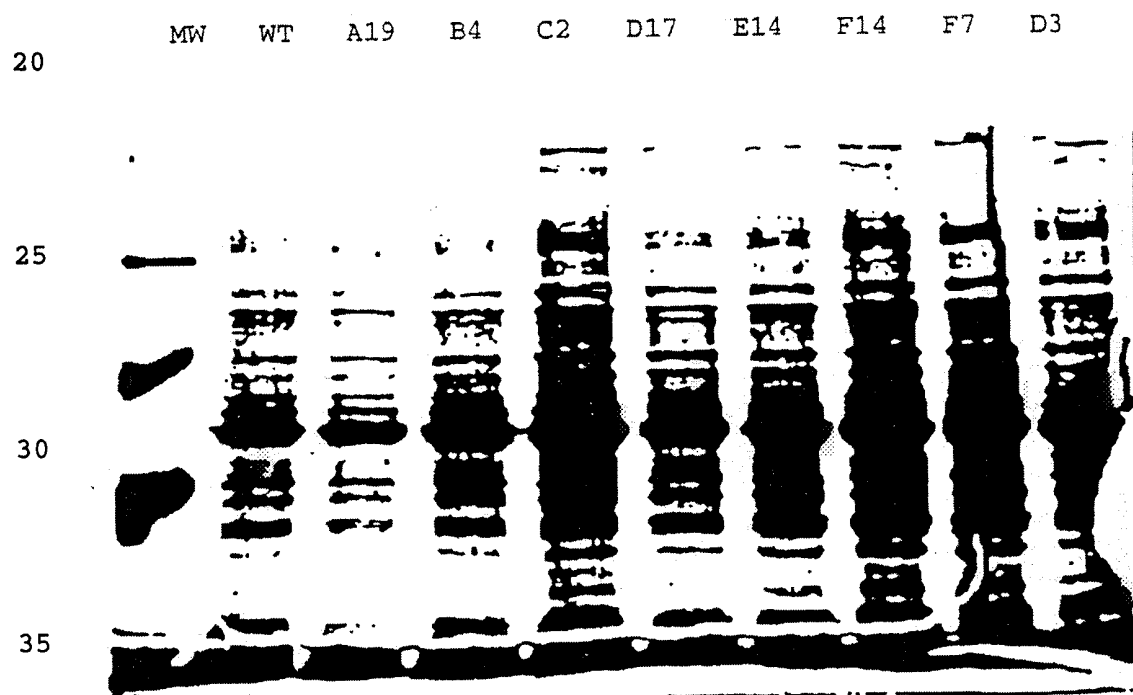
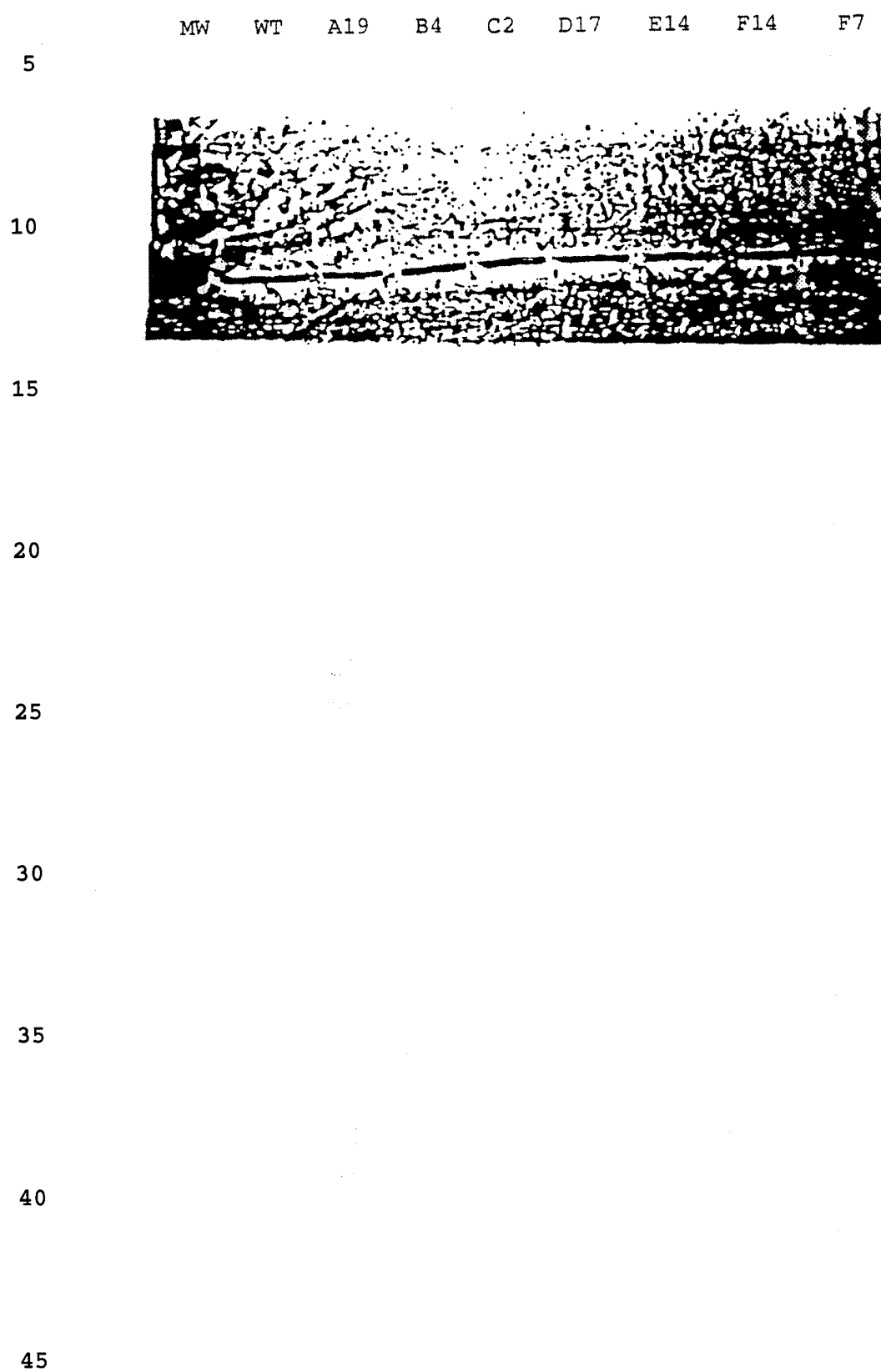


Abbildung 9: Westernanalyse



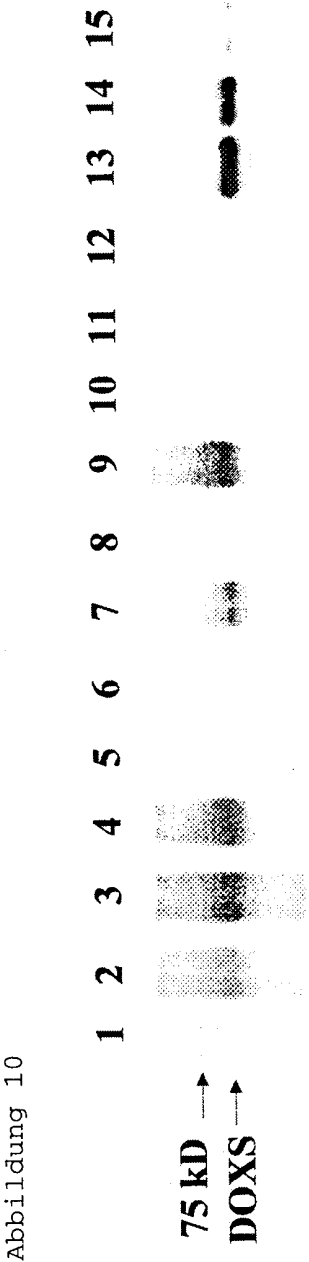
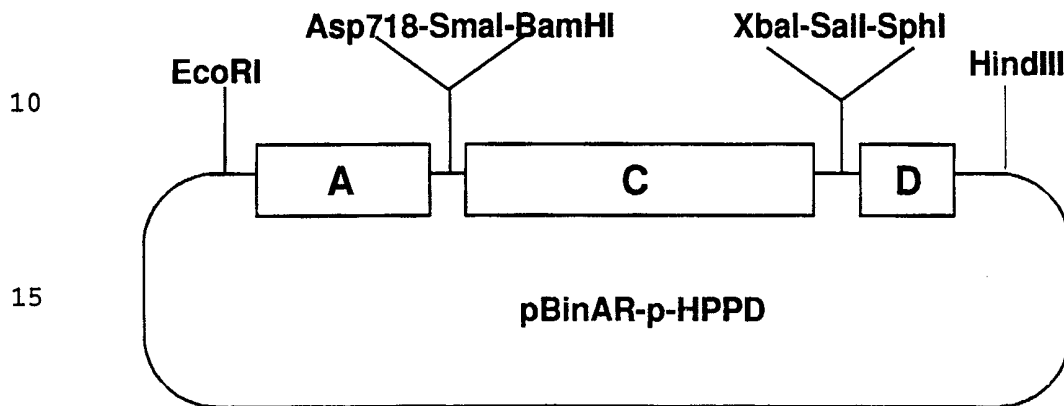


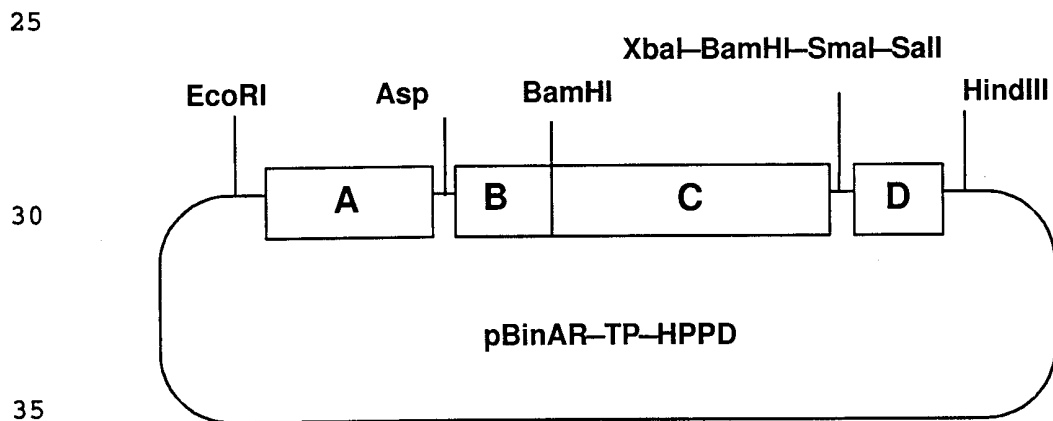
Abbildung 11

Binärer Vektor zur Überexpression des HPPD-Gens aus *Streptomyces*
5 *avermitilis* im Zytosol transgener Pflazen



20 Abbildung 12

Binärer Vektor zur Überexpression des HPPD-Gens aus *Streptomyces*
25 *avermitilis* im Plastiden transgener Pflanzen

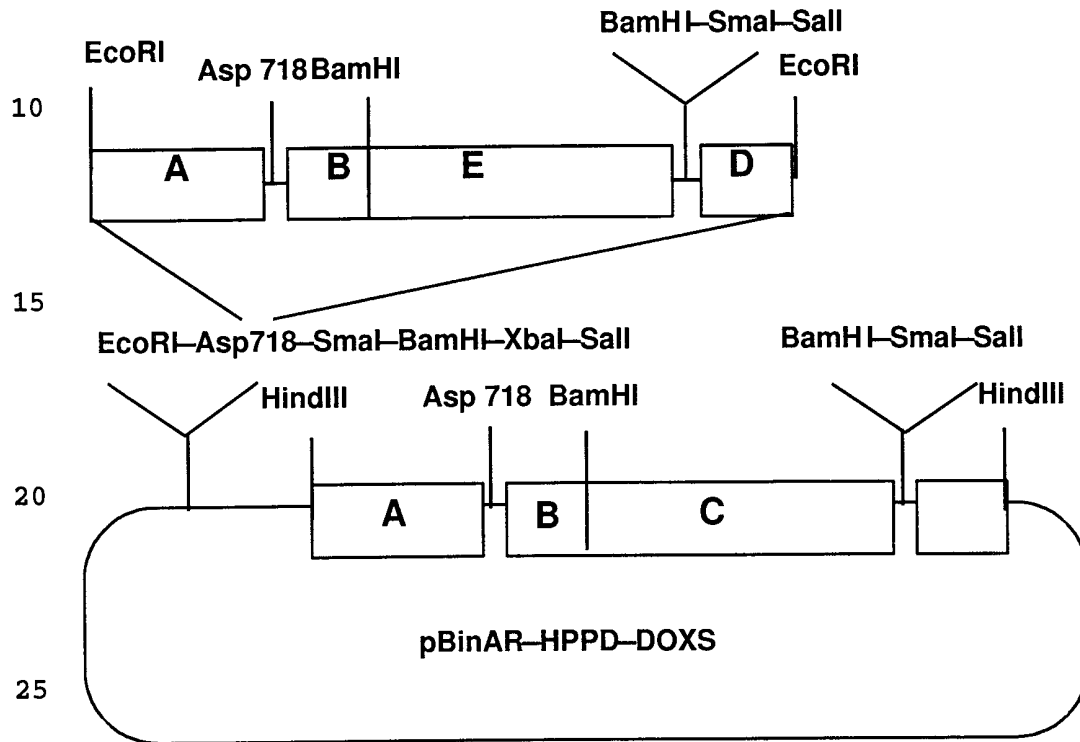


40

45

Abbildung 13

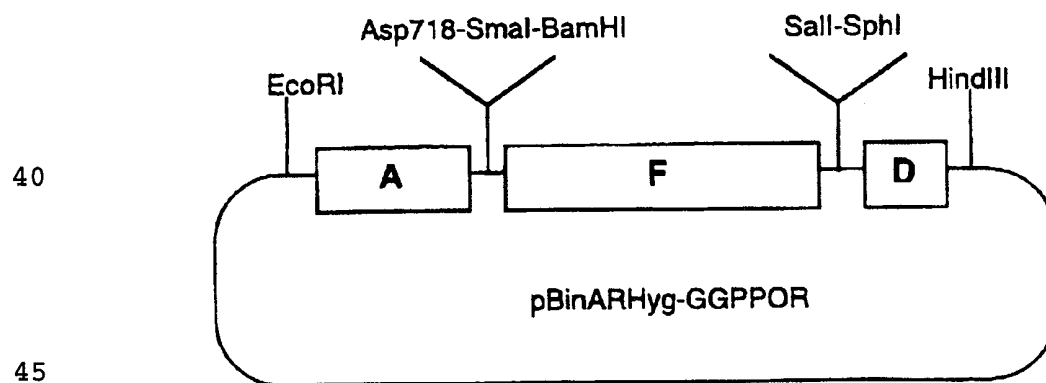
Binärer Vektor zur Überexpression des HPPD-gens aus *Streptomyces avermitilis* und des DOXS-Gens aus *E.coli* in Plastiden transgener 5 Pflanzen.



30 Abbildung 14

Binärer Vektor zur Überexpression des GGPPOR-Gens aus *Arabidopsis thaliana* in Plastiden transgener Pflanzen.

35



45

Abbildung 15

Binärer Vektor zur Überexpression des GGPPOR-Gens aus *Arabidopsis thaliana* und des DOXS-Gens aus *E. coli* in Plastiden transgener Pflanzen.

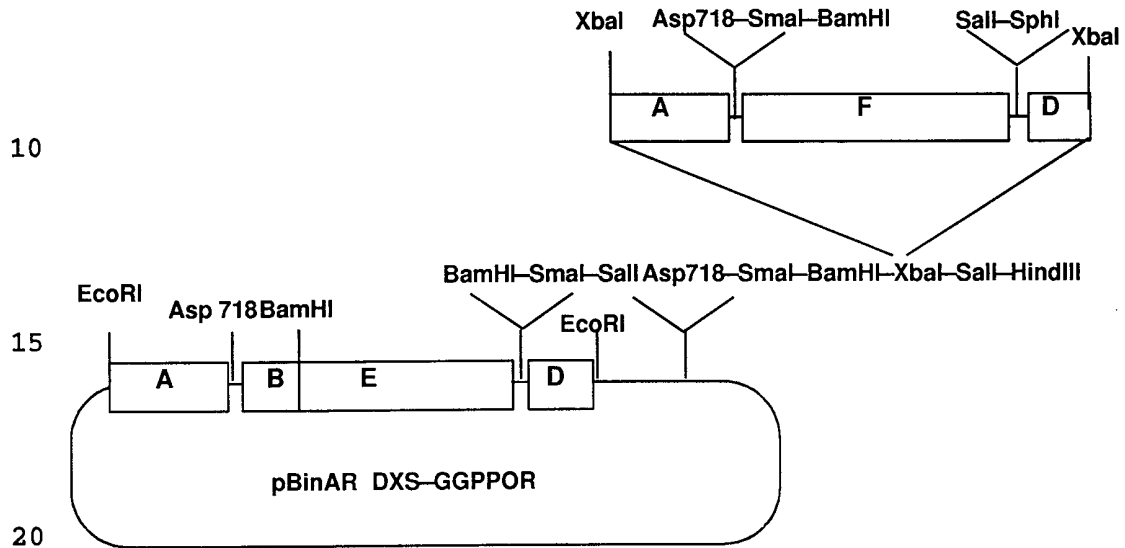
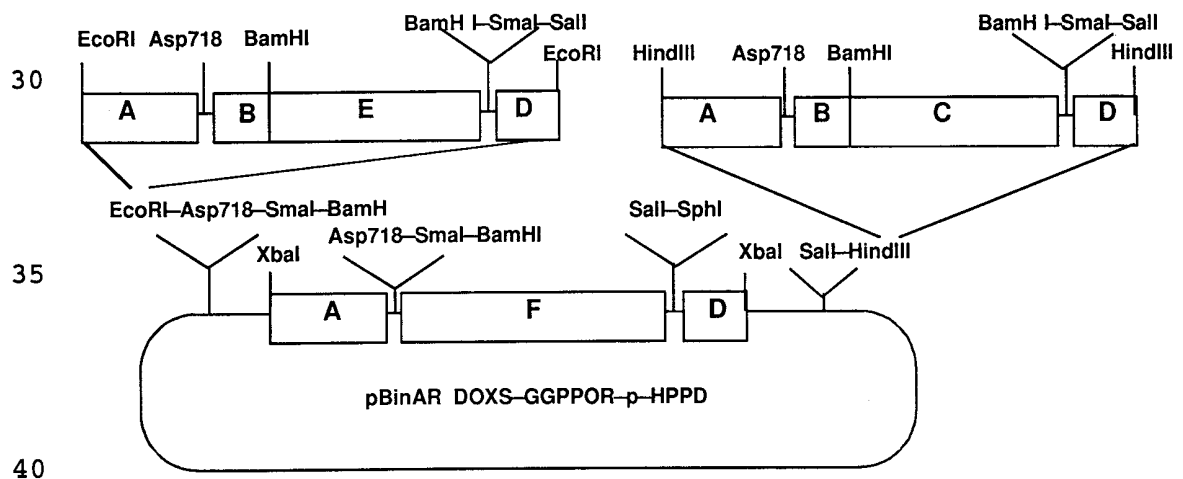


Abbildung 16

Binärer Vektor zur Überexpression des DOXS-Gens aus *E. coli*, des GGPPOR-Gens aus *Arabidopsis thaliana* und des HPPD-Gens aus *Streptomyces avermitilis* in den Plastiden transgener Pflanzen.



SEQUENZPROTOKOLL

<110> SunGene GmbH & Co.KGaA

<120> DNA-Sequenz kodierend fuer eine
1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase

<130> 0050/49249

<140> 0817 - 00006

<141> 1999-08-04

<160> 8

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 2458

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2154)

<400> 1

atg gct tct tct gca ttt gct ttt cct tct tac ata ata acc aaa gga	48
Met Ala Ser Ser Ala Phe Ala Phe Pro Ser Tyr Ile Ile Thr Lys Gly	
1 5 10 15	

gga ctt tca act gat tct tgt aaa tca act tct ttg tct tct tct aga	96
Gly Leu Ser Thr Asp Ser Cys Lys Ser Thr Ser Leu Ser Ser Ser Arg	
20 25 30	

tct ttg gtt aca gat ctt cca tca cca tgt ctg aaa ccc aac aac aat	144
Ser Leu Val Thr Asp Leu Pro Ser Pro Cys Leu Lys Pro Asn Asn Asn	
35 40 45	

tcc cat tca aac aga aga gca aaa gtg tgt gct tca ctt gca gag aag	192
Ser His Ser Asn Arg Arg Ala Lys Val Cys Ala Ser Leu Ala Glu Lys	
50 55 60	

ggt gaa tat tat tca aac aga cca cca act cca tta ctt gac act att	240
Gly Glu Tyr Tyr Ser Asn Arg Pro Pro Thr Pro Leu Leu Asp Thr Ile	
65 70 75 80	

aac tac cca atc cac atg aaa aat ctt tct gtc aag gaa ctg aaa caa	288
Asn Tyr Pro Ile His Met Lys Asn Leu Ser Val Lys Glu Leu Lys Gln	

85	90	95	
ctt tct gat gag ctg aga tca gac gtg atc ttt aat gtg tcg aaa acc			336
Leu Ser Asp Glu Leu Arg Ser Asp Val Ile Phe Asn Val Ser Lys Thr			
100	105	110	
ggt gga cat ttg ggg tca agt ctt ggt gtt gtg gag ctt act gtg gct			384
Gly Gly His Leu Gly Ser Ser Leu Gly Val Val Glu Leu Thr Val Ala			
115	120	125	
ctt cat tac att ttc aat act cca caa gac aag att ctt tgg gat gtt			432
Leu His Tyr Ile Phe Asn Thr Pro Gln Asp Lys Ile Leu Trp Asp Val			
130	135	140	
ggt cat cag tct tat cct cat aag att ctt act ggg aga aga gga aag			480
Gly His Gln Ser Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Gly Lys			
145	150	155	160
atg cct aca atg agg caa acc aat ggt ctc tct ggt ttc acc aaa cga			528
Met Pro Thr Met Arg Gln Thr Asn Gly Leu Ser Gly Phe Thr Lys Arg			
165	170	175	
gga gag agt gaa cat gat tgc ttt ggt act gga cac agc tca acc aca			576
Gly Glu Ser Glu His Asp Cys Phe Gly Thr Gly His Ser Ser Thr Thr			
180	185	190	
ata tct gct ggt tta gga atg gcg gta gga agg gat ttg aag ggg aag			624
Ile Ser Ala Gly Leu Gly Met Ala Val Gly Arg Asp Leu Lys Gly Lys			
195	200	205	
aac aac aat gtg gtt gct gtg att ggt gat ggt gcg atg acg gca gga			672
Asn Asn Asn Val Val Ala Val Ile Gly Asp Gly Ala Met Thr Ala Gly			
210	215	220	
cag gct tat gaa gcc atg aac aac gcc gga tat cta gac tct gat atg			720
Gln Ala Tyr Glu Ala Met Asn Asn Ala Gly Tyr Leu Asp Ser Asp Met			
225	230	235	240
att gtg att ctt aat gac aac aag caa gtc tca tta cct aca gct act			768
Ile Val Ile Leu Asn Asp Asn Lys Gln Val Ser Leu Pro Thr Ala Thr			
245	250	255	
ttg gat gga cca agt cca cct gtt ggt gca ttg agc agt gct ctt agt			816
Leu Asp Gly Pro Ser Pro Pro Val Gly Ala Leu Ser Ser Ala Leu Ser			
260	265	270	
cgg tta cag tct aac ccg gct ctc aga gag ttg aga gaa gtc gca aag			864
Arg Leu Gln Ser Asn Pro Ala Leu Arg Glu Leu Arg Glu Val Ala Lys			

275	280	285	
ggt atg aca aag caa ata ggc gga cca atg cat cag ttg gcg gct aag			912
Gly Met Thr Lys Gln Ile Gly Gly Pro Met His Gln Leu Ala Ala Lys			
290	295	300	
gta gat gtg tat gct cga gga atg ata agc ggt act gga tcg tca ctg			960
Val Asp Val Tyr Ala Arg Gly Met Ile Ser Gly Thr Gly Ser Ser Leu			
305	310	315	320
ttt gaa gaa ctc ggt ctt tac tat att ggt cca gtt gat ggg cac aac			1008
Phe Glu Glu Leu Gly Leu Tyr Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly His Asn			
	325	330	335
ata gat gat ttg gta gcc att ctt aaa gaa gtt aag agt acc aga acc			1056
Ile Asp Asp Leu Val Ala Ile Leu Lys Glu Val Lys Ser Thr Arg Thr			
	340	345	350
aca gga cct gta ctt att cat gtg gtg acg gag aaa ggt cgt ggt tat			1104
Thr Gly Pro Val Leu Ile His Val Val Thr Glu Lys Gly Arg Gly Tyr			
	355	360	365
cct tac gcg gag aga gct gat gac aaa tac cat ggt gtt gtg aaa ttt			1152
Pro Tyr Ala Glu Arg Ala Asp Asp Lys Tyr His Gly Val Val Lys Phe			
	370	375	380
gat cca gca acg ggt aga cag ttc aaa act act aat gag act caa tct			1200
Asp Pro Ala Thr Gly Arg Gln Phe Lys Thr Thr Asn Glu Thr Gln Ser			
385	390	395	400
tac aca act tac ttt gcg gag gca tta gtc gca gaa gca gag gta gac			1248
Tyr Thr Thr Tyr Phe Ala Glu Ala Leu Val Ala Glu Ala Glu Val Asp			
	405	410	415
aaa gat gtg gtt gcg att cat gca gcc atg gga ggt gga acc ggg tta			1296
Lys Asp Val Val Ala Ile His Ala Ala Met Gly Gly Gly Thr Gly Leu			
	420	425	430
aat ctc ttt caa cgt cgc ttc cca aca aga tgt ttc gat gta gga ata			1344
Asn Leu Phe Gln Arg Arg Phe Pro Thr Arg Cys Phe Asp Val Gly Ile			
	435	440	445
gcg gaa caa cac gca gtt act ttt gct gcg ggt tta gcc tgt gaa ggc			1392
Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Cys Glu Gly			
	450	455	460
ctt aaa ccc ttc tgt gca atc tat tcg tct ttc atg cag cgt gct tat			1440
Leu Lys Pro Phe Cys Ala Ile Tyr Ser Ser Phe Met Gln Arg Ala Tyr			

465	470	475	480	
gac cag gtt gtc cat gat gtt gat ttg caa aaa tta ccg gtg aga ttt				1488
Asp Gln Val Val His Asp Val Asp Leu Gln Lys Leu Pro Val Arg Phe				
	485	490	495	
gca atg gat aga gct gga ctc gtt gga gct gat ggt ccg aca cat tgt				1536
Ala Met Asp Arg Ala Gly Leu Val Gly Ala Asp Gly Pro Thr His Cys				
	500	505	510	
gga gct ttc gat gtg aca ttt atg gct tgt ctt cct aac atg ata gtg				1584
Gly Ala Phe Asp Val Thr Phe Met Ala Cys Leu Pro Asn Met Ile Val				
	515	520	525	
atg gct cca tca gat gaa gca gat ctc ttt aac atg gtt gca act gct				1632
Met Ala Pro Ser Asp Glu Ala Asp Leu Phe Asn Met Val Ala Thr Ala				
	530	535	540	
gtt gcg att gat gat cgt cct tct tgt ttc cgt tac cct aga ggt aac				1680
Val Ala Ile Asp Asp Arg Pro Ser Cys Phe Arg Tyr Pro Arg Gly Asn				
	545	550	555	560
ggt att gga gtt gca tta cct ccc gga aac aaa ggt gtt cca att gag				1728
Gly Ile Gly Val Ala Leu Pro Pro Gly Asn Lys Gly Val Pro Ile Glu				
	565	570	575	
att ggg aaa ggt aga att tta aag gaa gga gag aga gtt gcg ttg ttg				1776
Ile Gly Lys Gly Arg Ile Leu Lys Glu Gly Glu Arg Val Ala Leu Leu				
	580	585	590	
ggt tat ggc tca gca gtt cag agc tgt tta gga gcg gct gta atg ctc				1824
Gly Tyr Gly Ser Ala Val Gln Ser Cys Leu Gly Ala Ala Val Met Leu				
	595	600	605	
gaa gaa cgc gga tta aac gta act gta gcg gat gca cgg ttt tgc aag				1872
Glu Glu Arg Gly Leu Asn Val Thr Val Ala Asp Ala Arg Phe Cys Lys				
	610	615	620	
cca ttg gac cgt gct ctc att cgc agc tta gct aag tcg cac gag gtt				1920
Pro Leu Asp Arg Ala Leu Ile Arg Ser Leu Ala Lys Ser His Glu Val				
	625	630	635	640
ctg atc acg gtt gaa gaa ggt tcc att gga ggt ttt ggc tcg cac gtt				1968
Leu Ile Thr Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Gly Phe Gly Ser His Val				
	645	650	655	
gtt cag ttt ctt gct ctc gat ggt ctt ctt gat ggc aaa ctc aag tgg				2016
Val Gln Phe Leu Ala Leu Asp Gly Leu Leu Asp Gly Lys Leu Lys Trp				

660	665	670	
aga cca atg gta ctg cct gat cga tac att gat cac ggt gca cca gct			2064
Arg Pro Met Val Leu Pro Asp Arg Tyr Ile Asp His Gly Ala Pro Ala			
675	680	685	
gat caa cta gct gaa gct gga ctc atg cca tct cac atc gca gca acc			2112
Asp Gln Leu Ala Glu Ala Gly Leu Met Pro Ser His Ile Ala Ala Thr			
690	695	700	
gca ctt aac tta atc ggt gca cca agg gaa gct ctg ttt tga			2154
Ala Leu Asn Leu Ile Gly Ala Pro Arg Glu Ala Leu Phe			
705	710	715	
gagtaagaat ctgttggtta aaacatatgt atacaaacac tctaaatgca acccaagggtt			2214
tcttctaagt actgatcaga attcccgccc gagaagtcct ttggcaacag ctatatatat			2274
ttactaagat tgtgaagaga aaggcaaagg caaagggtgt gcaaagatta gtattataga			2334
taaaactggt atttggtttg taatttttagg attgtgatga gatcgtgttg taccaataac			2394
taacatcttg taaaatcaat tactctcttg tgatcttcaa taagcttgag tgacaaaaaa			2454
aaaa			2458

<210> 2

<211> 717

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Met Ala Ser Ser Ala Phe Ala Phe Pro Ser Tyr Ile Ile Thr Lys Gly			
1	5	10	15
Gly Leu Ser Thr Asp Ser Cys Lys Ser Thr Ser Leu Ser Ser Ser Arg			
20	25	30	
Ser Leu Val Thr Asp Leu Pro Ser Pro Cys Leu Lys Pro Asn Asn Asn			
35	40	45	
Ser His Ser Asn Arg Arg Ala Lys Val Cys Ala Ser Leu Ala Glu Lys			
50	55	60	
Gly Glu Tyr Tyr Ser Asn Arg Pro Pro Thr Pro Leu Leu Asp Thr Ile			
65	70	75	80

Asn	Tyr	Pro	Ile	His	Met	Lys	Asn	Leu	Ser	Val	Lys	Glu	Leu	Lys	Gln	85	90	95	
Leu	Ser	Asp	Glu	Leu	Arg	Ser	Asp	Val	Ile	Phe	Asn	Val	Ser	Lys	Thr	100	105	110	
Gly	Gly	His	Leu	Gly	Ser	Ser	Leu	Gly	Val	Val	Glu	Leu	Thr	Val	Ala	115	120	125	
Leu	His	Tyr	Ile	Phe	Asn	Thr	Pro	Gln	Asp	Lys	Ile	Leu	Trp	Asp	Val	130	135	140	
Gly	His	Gln	Ser	Tyr	Pro	His	Lys	Ile	Leu	Thr	Gly	Arg	Arg	Gly	Lys	145	150	155	160
Met	Pro	Thr	Met	Arg	Gln	Thr	Asn	Gly	Leu	Ser	Gly	Phe	Thr	Lys	Arg	165	170	175	
Gly	Glu	Ser	Glu	His	Asp	Cys	Phe	Gly	Thr	Gly	His	Ser	Ser	Thr	Thr	180	185	190	
Ile	Ser	Ala	Gly	Leu	Gly	Met	Ala	Val	Gly	Arg	Asp	Leu	Lys	Gly	Lys	195	200	205	
Asn	Asn	Asn	Val	Val	Ala	Val	Ile	Gly	Asp	Gly	Ala	Met	Thr	Ala	Gly	210	215	220	
Gln	Ala	Tyr	Glu	Ala	Met	Asn	Asn	Ala	Gly	Tyr	Leu	Asp	Ser	Asp	Met	225	230	235	240
Ile	Val	Ile	Leu	Asn	Asp	Asn	Lys	Gln	Val	Ser	Leu	Pro	Thr	Ala	Thr	245	250	255	
Leu	Asp	Gly	Pro	Ser	Pro	Pro	Val	Gly	Ala	Leu	Ser	Ser	Ala	Leu	Ser	260	265	270	
Arg	Leu	Gln	Ser	Asn	Pro	Ala	Leu	Arg	Glu	Leu	Arg	Glu	Val	Ala	Lys	275	280	285	
Gly	Met	Thr	Lys	Gln	Ile	Gly	Gly	Pro	Met	His	Gln	Leu	Ala	Ala	Lys	290	295	300	
Val	Asp	Val	Tyr	Ala	Arg	Gly	Met	Ile	Ser	Gly	Thr	Gly	Ser	Ser	Leu	305	310	315	320
Phe	Glu	Glu	Leu	Gly	Leu	Tyr	Tyr	Ile	Gly	Pro	Val	Asp	Gly	His	Asn	325	330	335	

Ile Asp Asp Leu Val Ala Ile Leu Lys Glu Val Lys Ser Thr Arg Thr
 340 345 350
 Thr Gly Pro Val Leu Ile His Val Val Thr Glu Lys Gly Arg Gly Tyr
 355 360 365
 Pro Tyr Ala Glu Arg Ala Asp Asp Lys Tyr His Gly Val Val Lys Phe
 370 375 380
 Asp Pro Ala Thr Gly Arg Gln Phe Lys Thr Thr Asn Glu Thr Gln Ser
 385 390 395 400
 Tyr Thr Thr Tyr Phe Ala Glu Ala Leu Val Ala Glu Ala Glu Val Asp
 405 410 415
 Lys Asp Val Val Ala Ile His Ala Ala Met Gly Gly Gly Thr Gly Leu
 420 425 430
 Asn Leu Phe Gln Arg Arg Phe Pro Thr Arg Cys Phe Asp Val Gly Ile
 435 440 445
 Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Cys Glu Gly
 450 455 460
 Leu Lys Pro Phe Cys Ala Ile Tyr Ser Ser Phe Met Gln Arg Ala Tyr
 465 470 475 480
 Asp Gln Val Val His Asp Val Asp Leu Gln Lys Leu Pro Val Arg Phe
 485 490 495
 Ala Met Asp Arg Ala Gly Leu Val Gly Ala Asp Gly Pro Thr His Cys
 500 505 510
 Gly Ala Phe Asp Val Thr Phe Met Ala Cys Leu Pro Asn Met Ile Val
 515 520 525
 Met Ala Pro Ser Asp Glu Ala Asp Leu Phe Asn Met Val Ala Thr Ala
 530 535 540
 Val Ala Ile Asp Asp Arg Pro Ser Cys Phe Arg Tyr Pro Arg Gly Asn
 545 550 555 560
 Gly Ile Gly Val Ala Leu Pro Pro Gly Asn Lys Gly Val Pro Ile Glu
 565 570 575
 Ile Gly Lys Gly Arg Ile Leu Lys Glu Gly Glu Arg Val Ala Leu Leu
 580 585 590

Gly Tyr Gly Ser Ala Val Gln Ser Cys Leu Gly Ala Ala Val Met Leu
595 600 605

Glu Glu Arg Gly Leu Asn Val Thr Val Ala Asp Ala Arg Phe Cys Lys
610 615 620

Pro Leu Asp Arg Ala Leu Ile Arg Ser Leu Ala Lys Ser His Glu Val
625 630 635 640

Leu Ile Thr Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Gly Phe Gly Ser His Val
645 650 655

Val Gln Phe Leu Ala Leu Asp Gly Leu Leu Asp Gly Lys Leu Lys Trp
660 665 670

Arg Pro Met Val Leu Pro Asp Arg Tyr Ile Asp His Gly Ala Pro Ala
675 680 685

Asp Gln Leu Ala Glu Ala Gly Leu Met Pro Ser His Ile Ala Ala Thr
690 695 700

Ala Leu Asn Leu Ile Gly Ala Pro Arg Glu Ala Leu Phe
705 710 715

<210> 3

<211> 1863

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1863)

<400> 3

atg agt ttt gat att gcc aaa tac ccg acc ctg gca ctg gtc gac tcc 48
Met Ser Phe Asp Ile Ala Lys Tyr Pro Thr Leu Ala Leu Val Asp Ser
1 5 10 15

acc cag gag tta cga ctg ttg ccg aaa gag agt tta ccg aaa ctc tgc 96
Thr Gln Glu Leu Arg Leu Leu Pro Lys Glu Ser Leu Pro Lys Leu Cys
20 25 30

gac gaa ctg cgc cgc tat tta ctc gac agc gtg agc cgt tcc agc ggg 144
Asp Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Ser Ser Gly
35 40 45

cac ttc gcc tcc ggg ctg ggc acg gtc gaa ctg acc gtg gcg ctg cac 192

His Phe Ala Ser Gly Leu Gly Thr Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His	
50 55 60	
tat gtc tac aac acc ccg ttt gac caa ttg att tgg gat gtg ggg cat	240
Tyr Val Tyr Asn Thr Pro Phe Asp Gln Leu Ile Trp Asp Val Gly His	
65 70 75 80	
cag gct tat ccg cat aaa att ttg acc gga cgc cgc gac aaa atc ggc	288
Gln Ala Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Ile Gly	
85 90 95	
acc atc cgt cag aaa ggc ggt ctg cac ccg ttc ccg tgg cgc ggc gaa	336
Thr Ile Arg Gln Lys Gly Gly Leu His Pro Phe Pro Trp Arg Gly Glu	
100 105 110	
agc gaa tat gac gta tta agc gtc ggg cat tca tca acc tcc atc agt	384
Ser Glu Tyr Asp Val Leu Ser Val Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser	
115 120 125	
gcc gga att ggt att gcg gtt gct gcc gaa aaa gaa ggc aaa aat cgc	432
Ala Gly Ile Gly Ile Ala Val Ala Ala Glu Lys Glu Gly Lys Asn Arg	
130 135 140	
cgc acc gtc tgt gtc att ggc gat ggc gcg att acc gca ggc atg gcg	480
Arg Thr Val Cys Val Ile Gly Asp Gly Ala Ile Thr Ala Gly Met Ala	
145 150 155 160	
ttt gaa gcg atg aat cac gcg ggc gat atc cgt cct gat atg ctg gtg	528
Phe Glu Ala Met Asn His Ala Gly Asp Ile Arg Pro Asp Met Leu Val	
165 170 175	
att ctc aac gac aat gaa atg tcg att tcc gaa aat gtc ggc gcg ctc	576
Ile Leu Asn Asp Asn Glu Met Ser Ile Ser Glu Asn Val Gly Ala Leu	
180 185 190	
aac aac cat ctg gca cag ctg ctt tcc ggt aag ctt tac tct tca ctg	624
Asn Asn His Leu Ala Gln Leu Leu Ser Gly Lys Leu Tyr Ser Ser Leu	
195 200 205	
cgc gaa ggc ggg aaa aaa gtt ttc tct ggc gtg ccg cca att aaa gag	672
Arg Glu Gly Gly Lys Lys Val Phe Ser Gly Val Pro Pro Ile Lys Glu	
210 215 220	
ctg ctc aaa cgc acc gaa gaa cat att aaa ggc atg gta gtg cct ggc	720
Leu Leu Lys Arg Thr Glu Glu His Ile Lys Gly Met Val Val Pro Gly	
225 230 235 240	
acg ttg ttt gaa gag ctg ggc ttt aac tac atc ggc ccg gtg gac ggt	768

10

Gly	Ala	Phe	Asp	Leu	Ser	Tyr	Leu	Arg	Cys	Ile	Pro	Glu	Met	Val	Ile		
	435						440					445					
atg	acc	ccg	agc	gat	gaa	aac	gaa	tgt	cgc	cag	atg	ctc	tat	acc	ggc	1392	
Met	Thr	Pro	Ser	Asp	Glu	Asn	Glu	Cys	Arg	Gln	Met	Leu	Tyr	Thr	Gly		
	450					455					460						
tat	cac	tat	aac	gat	ggc	ccg	tca	gcg	gtg	cgc	tac	ccg	cgt	ggc	aac	1440	
Tyr	His	Tyr	Asn	Asp	Gly	Pro	Ser	Ala	Val	Arg	Tyr	Pro	Arg	Gly	Asn		
465					470					475					480		
gcg	gtc	ggc	gtg	gaa	ctg	acg	ccg	ctg	gaa	aaa	cta	cca	att	ggc	aaa	1488	
Ala	Val	Gly	Val	Glu	Leu	Thr	Pro	Leu	Glu	Lys	Leu	Pro	Ile	Gly	Lys		
				485					490						495		
ggc	att	gtg	aag	cgt	cgt	ggc	gag	aaa	ctg	gcg	atc	ctt	aac	ttt	ggt	1536	
Gly	Ile	Val	Lys	Arg	Arg	Gly	Glu	Lys	Leu	Ala	Ile	Leu	Asn	Phe	Gly		
			500					505					510				
acg	ctg	atg	cca	gaa	gcg	gcg	aaa	gtc	gcc	gaa	tcg	ctg	aac	gcc	acg	1584	
Thr	Leu	Met	Pro	Glu	Ala	Ala	Lys	Val	Ala	Glu	Ser	Leu	Asn	Ala	Thr		
			515				520						525				
ctg	gtc	gat	atg	cgt	ttt	gtg	aaa	ccg	ctt	gat	gaa	gcg	tta	att	ctg	1632	
Leu	Val	Asp	Met	Arg	Phe	Val	Lys	Pro	Leu	Asp	Glu	Ala	Leu	Ile	Leu		
	530					535					540						
gaa	atg	gcc	gcc	agc	cat	gaa	gcg	ctg	gtc	acc	gta	gaa	gaa	aac	gcc	1680	
Glu	Met	Ala	Ala	Ser	His	Glu	Ala	Leu	Val	Thr	Val	Glu	Glu	Asn	Ala		
545					550					555					560		
att	atg	ggc	ggc	gca	ggc	agc	ggc	gtg	aac	gaa	gtg	ctg	atg	gcc	cat	1728	
Ile	Met	Gly	Gly	Ala	Gly	Ser	Gly	Val	Asn	Glu	Val	Leu	Met	Ala	His		
				565				570						575			
cgt	aaa	cca	gta	ccc	gtg	ctg	aac	att	ggc	ctg	ccg	gac	ttc	ttt	att	1776	
Arg	Lys	Pro	Val	Pro	Val	Leu	Asn	Ile	Gly	Leu	Pro	Asp	Phe	Phe	Ile		
			580				585						590				
ccg	caa	gga	act	cag	gaa	gaa	atg	cgc	gcc	gaa	ctc	ggc	ctc	gat	gcc	1824	
Pro	Gln	Gly	Thr	Gln	Glu	Glu	Met	Arg	Ala	Glu	Leu	Gly	Leu	Asp	Ala		
			595				600						605				
gct	ggt	atg	gaa	gcc	aaa	atc	aag	gcc	tgg	ctg	gca	taa				1863	
Ala	Gly	Met	Glu	Ala	Lys	Ile	Lys	Ala	Trp	Leu	Ala						
	610					615					620						

<210> 4

<211> 620

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 4

Met Ser Phe Asp Ile Ala Lys Tyr Pro Thr Leu Ala Leu Val Asp Ser
 1 5 10 15

Thr Gln Glu Leu Arg Leu Leu Pro Lys Glu Ser Leu Pro Lys Leu Cys
 20 25 30

Asp Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Ser Ser Gly
 35 40 45

His Phe Ala Ser Gly Leu Gly Thr Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His
 50 55 60

Tyr Val Tyr Asn Thr Pro Phe Asp Gln Leu Ile Trp Asp Val Gly His
 65 70 75 80

Gln Ala Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Ile Gly
 85 90 95

Thr Ile Arg Gln Lys Gly Gly Leu His Pro Phe Pro Trp Arg Gly Glu
 100 105 110

Ser Glu Tyr Asp Val Leu Ser Val Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser
 115 120 125

Ala Gly Ile Gly Ile Ala Val Ala Ala Glu Lys Glu Gly Lys Asn Arg
 130 135 140

Arg Thr Val Cys Val Ile Gly Asp Gly Ala Ile Thr Ala Gly Met Ala
 145 150 155 160

Phe Glu Ala Met Asn His Ala Gly Asp Ile Arg Pro Asp Met Leu Val
 165 170 175

Ile Leu Asn Asp Asn Glu Met Ser Ile Ser Glu Asn Val Gly Ala Leu
 180 185 190

Asn Asn His Leu Ala Gln Leu Leu Ser Gly Lys Leu Tyr Ser Ser Leu
 195 200 205

Arg Glu Gly Gly Lys Lys Val Phe Ser Gly Val Pro Pro Ile Lys Glu
 210 215 220

Leu Leu Lys Arg Thr Glu Glu His Ile Lys Gly Met Val Val Pro Gly
 225 230 235 240
 Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Asn Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly
 245 250 255
 His Asp Val Leu Gly Leu Ile Thr Thr Leu Lys Asn Met Arg Asp Leu
 260 265 270
 Lys Gly Pro Gln Phe Leu His Ile Met Thr Lys Lys Gly Arg Gly Tyr
 275 280 285
 Glu Pro Ala Glu Lys Asp Pro Ile Thr Phe His Ala Val Pro Lys Phe
 290 295 300
 Asp Pro Ser Ser Gly Cys Leu Pro Lys Ser Ser Gly Gly Leu Pro Ser
 305 310 315 320
 Tyr Ser Lys Ile Phe Gly Asp Trp Leu Cys Glu Thr Ala Ala Lys Asp
 325 330 335
 Asn Lys Leu Met Ala Ile Thr Pro Ala Met Arg Glu Gly Ser Gly Met
 340 345 350
 Val Glu Phe Ser Arg Lys Phe Pro Asp Arg Tyr Phe Asp Val Ala Ile
 355 360 365
 Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Ile Gly Gly
 370 375 380
 Tyr Lys Pro Ile Val Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Ala Tyr
 385 390 395 400
 Asp Gln Val Leu His Asp Val Ala Ile Gln Lys Leu Pro Val Leu Phe
 405 410 415
 Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ile Val Gly Ala Asp Gly Gln Thr His Gln
 420 425 430
 Gly Ala Phe Asp Leu Ser Tyr Leu Arg Cys Ile Pro Glu Met Val Ile
 435 440 445
 Met Thr Pro Ser Asp Glu Asn Glu Cys Arg Gln Met Leu Tyr Thr Gly
 450 455 460
 Tyr His Tyr Asn Asp Gly Pro Ser Ala Val Arg Tyr Pro Arg Gly Asn
 465 470 475 480

Ala Val Gly Val Glu Leu Thr Pro Leu Glu Lys Leu Pro Ile Gly Lys
 485 490 495

Gly Ile Val Lys Arg Arg Gly Glu Lys Leu Ala Ile Leu Asn Phe Gly
 500 505 510

Thr Leu Met Pro Glu Ala Ala Lys Val Ala Glu Ser Leu Asn Ala Thr
 515 520 525

Leu Val Asp Met Arg Phe Val Lys Pro Leu Asp Glu Ala Leu Ile Leu
 530 535 540

Glu Met Ala Ala Ser His Glu Ala Leu Val Thr Val Glu Glu Asn Ala
 545 550 555 560

Ile Met Gly Gly Ala Gly Ser Gly Val Asn Glu Val Leu Met Ala His
 565 570 575

Arg Lys Pro Val Pro Val Leu Asn Ile Gly Leu Pro Asp Phe Phe Ile
 580 585 590

Pro Gln Gly Thr Gln Glu Glu Met Arg Ala Glu Leu Gly Leu Asp Ala
 595 600 605

Ala Gly Met Glu Ala Lys Ile Lys Ala Trp Leu Ala
 610 615 620

<210> 5

<211> 1469

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<220>

<221> CDS

<222> (218)..(1138)

<400> 5

gatatccgag cgccgccggg tccactgcgg tccgaagccg cggatgactc cattcgactg 60

aagccgggtcg agccgcgcct gcacgggtgcc gcgcgcgacc ccgagccgcc gggacatctc 120

gagcactccg atgcgcggct cccgcgccag cagcaccagg agccggccgt ccagatgata 180

gatcgccacg gcagcccctc cagtggatcat cctgtac atg cag ccc cac gcc atg 235

Met Gln Pro His Ala Met

1

5

ggc ggt gca ctg aac aca ttg tcc agc gga caa gcc aac tat tgc gca	283
Gly Gly Ala Leu Asn Thr Leu Ser Ser Gly Gln Ala Asn Tyr Cys Ala	
10 15 20	
cct tgc gga acg gag cga ccc tgc cgc cat gac gca gac cac aca cca	331
Pro Cys Gly Thr Glu Arg Pro Cys Arg His Asp Ala Asp His Thr Pro	
25 30 35	
cac tcc cga cac cgc ccg gca ggc cga ccc ctt ccc ggt gaa ggg aat	379
His Ser Arg His Arg Pro Ala Gly Arg Pro Leu Pro Gly Glu Gly Asn	
40 45 50	
gga cgc ggt cgt ctt cgc cgt agg caa cgc caa gca ggc cgc gca cta	427
Gly Arg Gly Arg Leu Arg Arg Arg Gln Arg Gln Ala Gly Arg Ala Leu	
55 60 65 70	
ctc cac cgc ctt cgg cat gca gct tgt ggc gta ctc cgg acc gga gaa	475
Leu His Arg Leu Arg His Ala Ala Cys Gly Val Leu Arg Thr Gly Glu	
75 80 85	
cgg cag ccg cga gac cgc ttc gta cgt cct cac caa cgg ctc ggc acg	523
Arg Gln Pro Arg Asp Arg Phe Val Arg Pro His Gln Arg Leu Gly Thr	
90 95 100	
ctt cgt cct cac ctc cgt cat caa gcc cgc cac ccc ctg ggg cca ctt	571
Leu Arg Pro His Leu Arg His Gln Ala Arg His Pro Leu Gly Pro Leu	
105 110 115	
cct cgc cga cca tgt ggc cga gca cgg cga cgg cgt cgt cga cct cgc	619
Pro Arg Arg Pro Cys Gly Arg Ala Arg Arg Arg Arg Arg Pro Arg	
120 125 130	
cat cga ggt ccc gga cgc ccg cgc cgc cca cgc gta cgc gat cga gca	667
His Arg Gly Pro Gly Arg Pro Arg Arg Pro Arg Val Arg Asp Arg Ala	
135 140 145 150	
cgg cgc ccg ctc ggt cgc cga gcc gta cga gct gaa gga cga gca cgg	715
Arg Arg Pro Leu Gly Arg Arg Ala Val Arg Ala Glu Gly Arg Ala Arg	
155 160 165	
cac ggt cgt cct cgc cgc gat cgc cac cta cgg caa gac ccg cca cac	763
His Gly Arg Pro Arg Arg Asp Arg His Leu Arg Gln Asp Pro Pro His	
170 175 180	
cct cgt cga ccg gac cgg cta cga cgg ccc cta cct ccc cgg cta cgt	811
Pro Arg Arg Pro Asp Arg Leu Arg Arg Pro Leu Pro Pro Arg Leu Arg	
185 190 195	

ggc cgc cgc ccc gat cgt cga acc gcc cgc cca ccg cac ctt cca ggc 859
 Gly Arg Arg Pro Asp Arg Arg Thr Ala Arg Pro Pro His Leu Pro Gly
 200 205 210

cat cga cca ctg cgt cgg caa cgt cga gct cgg ccg gat gaa cga atg 907
 His Arg Pro Leu Arg Arg Gln Arg Arg Ala Arg Pro Asp Glu Arg Met
 215 220 225 230

ggt cgg ctt cta caa caa ggt cat ggg ctt cac gaa cat gaa gga gtt 955
 Gly Arg Leu Leu Gln Gln Gly His Gly Leu His Glu His Glu Gly Val
 235 240 245

cgt ggg cga cga cat cgc gac cga gta ctc ggc gct gat gtc gaa ggt 1003
 Arg Gly Arg Arg His Arg Asp Arg Val Leu Gly Ala Asp Val Glu Gly
 250 255 260

cgt ggc cga cgg cac gct caa ggt caa gtt ccc gat caa cga gcc cgc 1051
 Arg Gly Arg Arg His Ala Gln Gly Gln Val Pro Asp Gln Arg Ala Arg
 265 270 275

cct cgc caa gaa gaa gtc cca gat cga cga gta cct gga gtt cta cgg 1099
 Pro Arg Gln Glu Glu Val Pro Asp Arg Arg Val Pro Gly Val Leu Arg
 280 285 290

cgg cgc ggg cgt cca gca cat cgc gct gaa cac ggg tga catcgtcgag 1148
 Arg Arg Gly Arg Pro Ala His Arg Ala Glu His Gly
 295 300 305

acggtacgca cgatgcgcgc cgccggcgctc cagttcctgg acacgcccga ctcgtactac 1208

gacaccctcg gggagtgggt gggcgacacc cgcgtccccg tcgacaccct gcgcgagctg 1268

aagatcctcg cggaccgcca cgaggacggc tatctgctcc agatcttcac caagccggtc 1328

caggaccgcc cgacgggtctt cttcgagatc atcgaacgcc acggctcgat gggattcggc 1388

aagggcaact tcaaggccct gtctgaggcg atcgagcggg agcaggagaa gcggggcaac 1448

ctgtaggcgg cgcggcccgg g 1469

<210> 6

<211> 306

<212> PRT

<213> *Streptomyces avermitilis*

<400> 6

Met Gln Pro His Ala Met Gly Gly Ala Leu Asn Thr Leu Ser Ser Gly

1	5	10	15
Gln Ala Asn Tyr Cys Ala Pro Cys Gly Thr Glu Arg Pro Cys Arg His	20	25	30
Asp Ala Asp His Thr Pro His Ser Arg His Arg Pro Ala Gly Arg Pro	35	40	45
Leu Pro Gly Glu Gly Asn Gly Arg Gly Arg Leu Arg Arg Arg Gln Arg	50	55	60
Gln Ala Gly Arg Ala Leu Leu His Arg Leu Arg His Ala Ala Cys Gly	65	70	75
Val Leu Arg Thr Gly Glu Arg Gln Pro Arg Asp Arg Phe Val Arg Pro	85	90	95
His Gln Arg Leu Gly Thr Leu Arg Pro His Leu Arg His Gln Ala Arg	100	105	110
His Pro Leu Gly Pro Leu Pro Arg Arg Pro Cys Gly Arg Ala Arg Arg	115	120	125
Arg Arg Arg Arg Pro Arg His Arg Gly Pro Gly Arg Pro Arg Arg Pro	130	135	140
Arg Val Arg Asp Arg Ala Arg Arg Pro Leu Gly Arg Arg Ala Val Arg	145	150	155
Ala Glu Gly Arg Ala Arg His Gly Arg Pro Arg Arg Asp Arg His Leu	165	170	175
Arg Gln Asp Pro Pro His Pro Arg Arg Pro Asp Arg Leu Arg Arg Pro	180	185	190
Leu Pro Pro Arg Leu Arg Gly Arg Arg Pro Asp Arg Arg Thr Ala Arg	195	200	205
Pro Pro His Leu Pro Gly His Arg Pro Leu Arg Arg Gln Arg Arg Ala	210	215	220
Arg Pro Asp Glu Arg Met Gly Arg Leu Leu Gln Gln Gly His Gly Leu	225	230	235
His Glu His Glu Gly Val Arg Gly Arg Arg His Arg Asp Arg Val Leu	245	250	255
Gly Ala Asp Val Glu Gly Arg Gly Arg Arg His Ala Gln Gly Gln Val			

260 265 270
 Pro Asp Gln Arg Ala Arg Pro Arg Gln Glu Glu Val Pro Asp Arg Arg
 275 280 285
 Val Pro Gly Val Leu Arg Arg Arg Gly Arg Pro Ala His Arg Ala Glu
 290 295 300
 His Gly
 305

<210> 7

<211> 1479

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1401)

<400> 7

atg gcg acg acg gtt aca ctc aaa tcc ttc acc gga ctt cgt caa tca 48
 Met Ala Thr Thr Val Thr Leu Lys Ser Phe Thr Gly Leu Arg Gln Ser
 1 5 10 15
 tca acg gag caa aca aac ttc gtc tct cat gta ccg tca tca ctt tct 96
 Ser Thr Glu Gln Thr Asn Phe Val Ser His Val Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30
 ctc cct caa cga cgg acc tct ctc cga gta acc gca gcc agg gcc act 144
 Leu Pro Gln Arg Arg Thr Ser Leu Arg Val Thr Ala Ala Arg Ala Thr
 35 40 45
 ccc aaa ctc tcc aac cgt aaa ctc cgt gtc gcc gtc atc ggt ggt gga 192
 Pro Lys Leu Ser Asn Arg Lys Leu Arg Val Ala Val Ile Gly Gly Gly
 50 55 60
 cca gca ggc ggg gca gct gca gag act cta gca caa gga gga atc gag 240
 Pro Ala Gly Gly Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ala Gln Gly Gly Ile Glu
 65 70 75 80
 acg att ctc atc gag cgt aag atg gac aat tgc aag cct tgc ggt ggc 288
 Thr Ile Leu Ile Glu Arg Lys Met Asp Asn Cys Lys Pro Cys Gly Gly
 85 90 95
 gcg att cct ctc tgt atg gtc gga gaa ttc aac ttg ccg ttg gat att 336
 Ala Ile Pro Leu Cys Met Val Gly Glu Phe Asn Leu Pro Leu Asp Ile

100	105	110	
att gat cgg aga gtg acg aag atg aag atg att tcg ccg tcg aac att			384
Ile Asp Arg Arg Val Thr Lys Met Lys Met Ile Ser Pro Ser Asn Ile			
115	120	125	
gct gtt gat att ggt cgt acg ctt aag gag cat gag tat ata ggt atg			432
Ala Val Asp Ile Gly Arg Thr Leu Lys Glu His Glu Tyr Ile Gly Met			
130	135	140	
gtg aga aga gaa gtt ctt gat gct tat ctg aga gag aga gct gag aag			480
Val Arg Arg Glu Val Leu Asp Ala Tyr Leu Arg Glu Arg Ala Glu Lys			
145	150	155	160
agt gga gcc act gtg att aac ggt ctc ttc ctt aag atg gat cat ccg			528
Ser Gly Ala Thr Val Ile Asn Gly Leu Phe Leu Lys Met Asp His Pro			
165	170	175	
gag aat tgg gac tcg ccg tac act ttg cat tac act gag tac gat ggt			576
Glu Asn Trp Asp Ser Pro Tyr Thr Leu His Tyr Thr Glu Tyr Asp Gly			
180	185	190	
aaa act gga gct aca ggg acg aag aaa aca atg gag gtt gat gct gtc			624
Lys Thr Gly Ala Thr Gly Thr Lys Lys Thr Met Glu Val Asp Ala Val			
195	200	205	
att gga gct gat gga gct aac tct agg gtt gct aaa tct att gat gct			672
Ile Gly Ala Asp Gly Ala Asn Ser Arg Val Ala Lys Ser Ile Asp Ala			
210	215	220	
ggt gat tac gac tac gca att gca ttt cag gag agg att agg att cct			720
Gly Asp Tyr Asp Tyr Ala Ile Ala Phe Gln Glu Arg Ile Arg Ile Pro			
225	230	235	240
gat gag aaa atg act tac tat gag gat tta gct gag atg tat gtt gga			768
Asp Glu Lys Met Thr Tyr Tyr Glu Asp Leu Ala Glu Met Tyr Val Gly			
245	250	255	
gat gat gtg tcg ccg gat ttc tat ggt tgg gtg ttc cct aag tgc gac			816
Asp Asp Val Ser Pro Asp Phe Tyr Gly Trp Val Phe Pro Lys Cys Asp			
260	265	270	
cat gta gct gtt gga aca ggt act gtg act cac aaa ggt gac atc aag			864
His Val Ala Val Gly Thr Gly Thr Val Thr His Lys Gly Asp Ile Lys			
275	280	285	
aag ttc cag ctc gcg acc aga aac aga gct aag gac aag att ctt gga			912
Lys Phe Gln Leu Ala Thr Arg Asn Arg Ala Lys Asp Lys Ile Leu Gly			

290	295	300	
ggg aag atc atc cgt gtg gag gct cat ccg att cct gaa cat ccg aga			960
Gly Lys Ile Ile Arg Val Glu Ala His Pro Ile Pro Glu His Pro Arg			
305	310	315	320
cca cgt agg ctc tcg aaa cgt gtg gct ctt gta ggt gat gct gca ggg			1008
Pro Arg Arg Leu Ser Lys Arg Val Ala Leu Val Gly Asp Ala Ala Gly			
	325	330	335
tat gtg act aaa tgc tct ggt gaa ggg atc tac ttt gct gct aag agt			1056
Tyr Val Thr Lys Cys Ser Gly Glu Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Lys Ser			
	340	345	350
gga aga atg tgt gct gaa gcc att gtc gaa ggt tca cag aat ggt aag			1104
Gly Arg Met Cys Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly Ser Gln Asn Gly Lys			
	355	360	365
aag atg att gac gaa ggg gac ttg agg aag tac ttg gag aaa tgg gat			1152
Lys Met Ile Asp Glu Gly Asp Leu Arg Lys Tyr Leu Glu Lys Trp Asp			
	370	375	380
aag aca tac ttg cct acc tac agg gta ctt gat gtg ttg cag aaa gtg			1200
Lys Thr Tyr Leu Pro Thr Tyr Arg Val Leu Asp Val Leu Gln Lys Val			
	385	390	395
ttt tac aga tca aat ccg gct aga gaa gcg ttt gtg gag atg tgt aat			1248
Phe Tyr Arg Ser Asn Pro Ala Arg Glu Ala Phe Val Glu Met Cys Asn			
	405	410	415
gat gag tat gtt cag aag atg aca ttc gat agc tat ctg tac aag cgg			1296
Asp Glu Tyr Val Gln Lys Met Thr Phe Asp Ser Tyr Leu Tyr Lys Arg			
	420	425	430
gtt gcg ccg ggt agt cct ttg gag gat atc aag ttg gct gtg aac acc			1344
Val Ala Pro Gly Ser Pro Leu Glu Asp Ile Lys Leu Ala Val Asn Thr			
	435	440	445
att gga agt ttg gtt agg gct aat gct cta agg aga gag att gag aag			1392
Ile Gly Ser Leu Val Arg Ala Asn Ala Leu Arg Arg Glu Ile Glu Lys			
	450	455	460
ctt agt gtt taagaaacaa ataatgaggt ctatctcctt tcttcatctc			1441
Leu Ser Val			
	465		
tatctctctt tttttgtctg ttagtaatct atctacac			1479

<210> 8

<211> 467

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 8

Met Ala Thr Thr Val Thr Leu Lys Ser Phe Thr Gly Leu Arg Gln Ser
 1 5 10 15

Ser Thr Glu Gln Thr Asn Phe Val Ser His Val Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

Leu Pro Gln Arg Arg Thr Ser Leu Arg Val Thr Ala Ala Arg Ala Thr
 35 40 45

Pro Lys Leu Ser Asn Arg Lys Leu Arg Val Ala Val Ile Gly Gly Gly
 50 55 60

Pro Ala Gly Gly Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ala Gln Gly Gly Ile Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Leu Ile Glu Arg Lys Met Asp Asn Cys Lys Pro Cys Gly Gly
 85 90 95

Ala Ile Pro Leu Cys Met Val Gly Glu Phe Asn Leu Pro Leu Asp Ile
 100 105 110

Ile Asp Arg Arg Val Thr Lys Met Lys Met Ile Ser Pro Ser Asn Ile
 115 120 125

Ala Val Asp Ile Gly Arg Thr Leu Lys Glu His Glu Tyr Ile Gly Met
 130 135 140

Val Arg Arg Glu Val Leu Asp Ala Tyr Leu Arg Glu Arg Ala Glu Lys
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Thr Val Ile Asn Gly Leu Phe Leu Lys Met Asp His Pro
 165 170 175

Glu Asn Trp Asp Ser Pro Tyr Thr Leu His Tyr Thr Glu Tyr Asp Gly
 180 185 190

Lys Thr Gly Ala Thr Gly Thr Lys Lys Thr Met Glu Val Asp Ala Val
 195 200 205

Ile Gly Ala Asp Gly Ala Asn Ser Arg Val Ala Lys Ser Ile Asp Ala
 210 215 220

Gly Asp Tyr Asp Tyr Ala Ile Ala Phe Gln Glu Arg Ile Arg Ile Pro
 225 230 235 240
 Asp Glu Lys Met Thr Tyr Tyr Glu Asp Leu Ala Glu Met Tyr Val Gly
 245 250 255
 Asp Asp Val Ser Pro Asp Phe Tyr Gly Trp Val Phe Pro Lys Cys Asp
 260 265 270
 His Val Ala Val Gly Thr Gly Thr Val Thr His Lys Gly Asp Ile Lys
 275 280 285
 Lys Phe Gln Leu Ala Thr Arg Asn Arg Ala Lys Asp Lys Ile Leu Gly
 290 295 300
 Gly Lys Ile Ile Arg Val Glu Ala His Pro Ile Pro Glu His Pro Arg
 305 310 315 320
 Pro Arg Arg Leu Ser Lys Arg Val Ala Leu Val Gly Asp Ala Ala Gly
 325 330 335
 Tyr Val Thr Lys Cys Ser Gly Glu Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Lys Ser
 340 345 350
 Gly Arg Met Cys Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly Ser Gln Asn Gly Lys
 355 360 365
 Lys Met Ile Asp Glu Gly Asp Leu Arg Lys Tyr Leu Glu Lys Trp Asp
 370 375 380
 Lys Thr Tyr Leu Pro Thr Tyr Arg Val Leu Asp Val Leu Gln Lys Val
 385 390 395 400
 Phe Tyr Arg Ser Asn Pro Ala Arg Glu Ala Phe Val Glu Met Cys Asn
 405 410 415
 Asp Glu Tyr Val Gln Lys Met Thr Phe Asp Ser Tyr Leu Tyr Lys Arg
 420 425 430
 Val Ala Pro Gly Ser Pro Leu Glu Asp Ile Lys Leu Ala Val Asn Thr
 435 440 445
 Ile Gly Ser Leu Val Arg Ala Asn Ala Leu Arg Arg Glu Ile Glu Lys
 450 455 460
 Leu Ser Val
 465

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/05467

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/53 C12N15/54 C12N15/82 C12N9/10 C12N9/04 C12Q1/02 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 A01H		
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)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LANGE B M ET AL: "A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1998 MAR 3) 95 (5) 2100-4. , XP002116672 cited in the application	1,2,9, 13,17,18
Y	see particularly the last paragraph	20,21
X	MANDEL A. ET AL.: "CLA1, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution" PLANT JOURNAL, vol. 9, no. 5, 1996, pages 649-658, XP002122907 the whole document	22
-/-		
☒ 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. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
17 November 1999		03/12/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentkanal 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Kania, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/05467

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 723 017 A (BASF AG) 24 July 1996 (1996-07-24) page 3, line 35-54	20,21
A	WO 97 27285 A (UNIV ARIZONA) 31 July 1997 (1997-07-31) cited in the application the whole document	1-22
A	WO 98 06862 A (SHEWMAKER CHRISTINE K ; CALGENE INC (US)) 19 February 1998 (1998-02-19) the whole document	1-22
A	LOIS L M ET AL: "Cloning and characterization of a gene from Escherichia coli encoding a transketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin and pyridoxol biosynthesis." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1998 MAR 3) 95 (5) 2105-10. , XP002116673 the whole document	1-22
A	SPRENGER G A ET AL: "Identification of a thiamin-dependent synthase in Escherichia coli required for the formation of the 1-deoxy-D- xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1997 NOV 25) 94 (24) 12857-62. , XP002116674 cited in the application the whole document	1-22
A	KELLER ET AL: "metabolic compartmentation of plastid prenyllipid biosynthesis - evidence for the involvement of a multifunctional geranylgeranyl reductase" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, DE, BERLIN, vol. 251, no. 1/02, page 413-417-417 XP002100518 ISSN: 0014-2956 cited in the application the whole document	1-22
P, X	WO 99 11757 A (MCCASKILL DAVID G ; LANGE BERND M (US); UNIV WASHINGTON (US); WILDU) 11 March 1999 (1999-03-11) see particularly Page 14 line 29 to Page 15 line 21.	1,2,9, 13,17-22
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/05467

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	DE 197 52 700 A (HOECHST SCHERING AGREVO GMBH) 2 June 1999 (1999-06-02) see particularly Page 6 line 20 and following; Example 6	20, 21
E	WO 99 52938 A (HASSAN JOMAA) 21 October 1999 (1999-10-21) the whole document	18-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/05467

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0723017	A	24-07-1996	DE 19501906 A CA 2167768 A US 5912169 A US 5925535 A	25-07-1996 24-07-1996 15-06-1999 20-07-1999
WO 9727285	A	31-07-1997	AU 1845397 A EP 0877793 A JP 11510708 T	20-08-1997 18-11-1998 21-09-1999
WO 9806862	A	19-02-1998	AU 4058497 A CN 1227609 A EP 0925366 A	06-03-1998 01-09-1999 30-06-1999
WO 9911757	A	11-03-1999	AU 8925898 A	22-03-1999
DE 19752700	A	02-06-1999	DE 29800547 U JP 11169186 A	08-04-1999 29-06-1999
WO 9952938	A	21-10-1999	DE 19825585 A WO 9952515 A	21-10-1999 21-10-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In nationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/05467

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/53 C12N15/54 C12N15/82 C12N9/10 C12N9/04
C12Q1/02 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 A01H

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)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LANGE B M ET AL: "A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1998 MAR 3) 95 (5) 2100-4. , XP002116672 in der Anmeldung erwähnt	1,2,9, 13,17,18
Y	siehe insbesondere den letzten Absatz	20,21
X	MANDEL A. ET AL.: "CLA1, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution" PLANT JOURNAL, Bd. 9, Nr. 5, 1996, Seiten 649-658, XP002122907 das ganze Dokument	22



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 erfindeterischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindeterischer 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

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

17. November 1999

Abenddatum des Internationalen Recherchenberichts

03/12/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Bevollmächtigter Bediensteter

Kania, T

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 723 017 A (BASF AG) 24. Juli 1996 (1996-07-24) Seite 3, Zeile 35-54 —	20,21
A	WO 97 27285 A (UNIV ARIZONA) 31. Juli 1997 (1997-07-31) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument —	1-22
A	WO 98 06862 A (SHEWMAKER CHRISTINE K ; CALGENE INC (US)) 19. Februar 1998 (1998-02-19) das ganze Dokument —	1-22
A	LOIS L M ET AL: "Cloning and characterization of a gene from Escherichia coli encoding a transketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin and pyridoxol biosynthesis." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1998 MAR 3) 95 (5) 2105-10. , XP002116673 das ganze Dokument —	1-22
A	SPRENGER G A ET AL: "Identification of a thiamin-dependent synthase in Escherichia coli required for the formation of the 1-deoxy-D- xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1997 NOV 25) 94 (24) 12857-62. , XP002116674 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument —	1-22
A	KELLER ET AL: "metabolic compartmentation of plastid prenyllipid biosynthesis - evidence for the involvement of a multifunctional geranylgeranyl reductase" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, DE, BERLIN, Bd. 251, Nr. 1/02, Seite 413-417-417 XP002100518 ISSN: 0014-2956 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument —	1-22
P, X	WO 99 11757 A (MCCASKILL DAVID G ; LANGE BERND M (US); UNIV WASHINGTON (US); WILDU) 11. März 1999 (1999-03-11) siehe insbesondere S.14 Z.29 bis S.15 Z.21 —	1,2,9, 13,17-22
	— -/-	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	DE 197 52 700 A (HOECHST SCHERING AGREVO GMBH) 2. Juni 1999 (1999-06-02) siehe insbesondere S.6 Z.20 ff.; Beispiel 6	20,21
E	WO 99 52938 A (HASSAN JOMAA) 21. Oktober 1999 (1999-10-21) das ganze Dokument	18-22

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/05467

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0723017 A	24-07-1996	DE 19501906 A CA 2167768 A US 5912169 A US 5925535 A	25-07-1996 24-07-1996 15-06-1999 20-07-1999
WO 9727285 A	31-07-1997	AU 1845397 A EP 0877793 A JP 11510708 T	20-08-1997 18-11-1998 21-09-1999
WO 9806862 A	19-02-1998	AU 4058497 A CN 1227609 A EP 0925366 A	06-03-1998 01-09-1999 30-06-1999
WO 9911757 A	11-03-1999	AU 8925898 A	22-03-1999
DE 19752700 A	02-06-1999	DE 29800547 U JP 11169186 A	08-04-1999 29-06-1999
WO 9952938 A	21-10-1999	DE 19825585 A WO 9952515 A	21-10-1999 21-10-1999