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

(10) **DE 696 34 630 T2** 2005.11.10

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 813 604 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 34 630.3**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP96/00686**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 904 817.2**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 96/027673**
(86) PCT-Anmeldetag: **19.02.1996**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **12.09.1996**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **29.12.1997**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **20.04.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **10.11.2005**

(51) Int Cl.[7]: **C12N 15/82**
C12N 15/12, A01H 5/00

(30) Unionspriorität:
398037 **03.03.1995** **US**

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

(73) Patentinhaber:
Syngenta Participations AG, Basel, CH

(74) Vertreter:
HOFFMANN & EITLE, 81925 München

(72) Erfinder:
GOFF, Stephen Arthur, Durham, US; CROSSLAND, Lyle Dean, Chapel Hill, US; PRIVALLE, Laura Stein, Durham, US

(54) Bezeichnung: **KONTROLLE DER PFLANZENGENEXPRESSION DURCH REZEPTOR-VERMITTELTE TRANSAKTIVATION IN GEGENWART VON EINEM CHEMISCHEN LIGAND**

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

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

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die chemische Kontrolle der Genexpression in Pflanzen. Insbesondere betrifft sie ein Verfahren, durch das Rezeptorpolypeptide in Gegenwart eines geeigneten chemischen Liganden die Expression eines Zielpolypeptids in einer Pflanzenzelle regulieren, sowie die Expressionskassetten, die den Rezeptor und Zielpolypeptide codieren, und transgene Pflanzen, die die Expressionskassetten enthalten.

[0002] In einigen Fällen ist es wünschenswert, den Zeitpunkt oder das Ausmaß der Expression eines phänotypischen Merkmals in Pflanzen, Pflanzenzellen oder Pflanzengewebe zu kontrollieren. Eine ideale Situation wäre die Regulierung der Expression eines solchen Merkmals nach Wunsch, ausgelöst durch eine Chemikalie, die leicht auf Feldpflanzen, Ziersträucher etc. ausgebracht werden könnte. Ein solches System der Regulierung der Genexpression, das zum Erreichen dieser idealen Situation verwendet werden könnte, bislang unbekannt in Pflanzen in natürlicher Weise, ist die Steroid- und Thyroidhormon-Superfamilie von Kernrezeptoren.

[0003] Die Steroid- und Thyroidhormon-Superfamilie von Kernrezeptoren wird in Säugetieren und Insekten gefunden und besteht aus über 100 bekannten Proteinen. Diese Rezeptoren fallen in wenigstens zwei funktionell unterschiedliche Kategorien, die als Klasse I und Klasse II bekannt sind. Beato, Cell 56: 335–344 (1989); Parker, Sem. Cancer Biol. Ser. 1: 81–87 (1990). Von diesen zwei Klassen funktionieren nur die Klasse II-Rezeptoren im Kern als Heterodimere, um die Expression von Zielgenen in Gegenwart von Hormon zu beeinflussen. Die am besten untersuchten Beispiele für Klasse II-Rezeptorproteine sind der Retinolsäurerezeptor (RAR), Vitamin D-Rezeptor (VDR) und Thyroidhormonrezeptor (T_3R) und Retinoic X-Rezeptor (RXR). Die Rezeptoren binden an die 5'-regulatorische Region des Zielgens, und bei Bindung eines chemischen Liganden an den Rezeptor beeinflußt die Transkriptionsaktivierungs-(Transaktivierungs)-Domäne des Rezeptors die Genexpression durch Wechselwirkung mit anderen Transkriptionsstartfaktoren.

[0004] Zusätzlich zu den oben beschriebenen, in Säugetieren gefundenen Klasse II-Rezeptorproteinen wurden Rezeptoren ähnlicher Struktur und Aktivität im Insekt Drosophila identifiziert. Koelle et al. Cell 67: 59 (1991); Christianson und Kafatos, Biochem. Biophys. Res. Comm. 193: 1318 (1993); Henrich et al., Nucleic Acids Res. 18: 4143 (1990). Der Ecdyson-Rezeptor (EcR) bindes das Steroidhormon 20-Hydroxyecdyson und wird die Genexpression transaktivieren, wenn er mit dem Produkt des Ultraspiracle-(USP)-Gens heterodimerisiert. USP ist am meisten homolog mit RXRα, und RXR kann Heterodimere mit EcR bilden. Thomas et al., Nature 362: 471–475 (1993). Zusätzliche chemische Liganden neben 20-Hydroxyecdyson, wie andere Hormonagonisten oder -antagonisten, werden ebenfalls an diese Rezeptoren binden und eine Transaktivierung eines Zielgens verursachen.

[0005] Es wurde gezeigt, daß ein Mitglied der Steroid- und Thyroid-Superfamilie von Kernrezeptoren, der Klasse I-Glukokortikoidrezeptor (GR), der Chaperonine verwendet und nicht durch Heterodimerisierung mit anderen Rezeptoren funktioniert, ein Zielgen in Pflanzenzellen transaktiviert. Schena et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10421–10425 (1991). Ein Fragment, das die Ligandenbindungsdomäne aus GR enthält, wurde an das als "R" bekannte regulatorische Anthocyanin-Protein gebunden, und es wurde gezeigt, daß es die Produktion von Anthocyanin in transgener Arabidopsis thaliana als Reaktion auf die Anwendung des entsprechenden chemischen Liganden stimuliert. Lloyd et al., Science 226: 436 (1994). Es wurde ebenfalls von Lloyd et al. berichtet, daß GR voller Länge nicht die Genexpression in stabil transformierter Arabidopsis thaliana aktivierte, wohingegen es dies in vorübergehenden Assays in Tabakprotoplasten tat. Außerdem stimulierten auch Fusionen von R mit einem Fragment aus dem Estrogenrezeptor (ER), ein anderer Klasse I-Rezeptor, der Chaperonine verwendet, die Produktion von Anthocyanin in Gegenwart des geeigneten chemischen Liganden, aber sie zeigten eine "substantielle" Hintergrundexpression.

[0006] Das unterscheidende Merkmal der Klasse II-Rezeptorproteine, die Transaktivierung eines Zielgens durch heterodimerisierte Rezeptoren in Gegenwart eines geeigneten chemischen Liganden, bietet zuvor unbekannte Möglichkeiten zur chemischen Kontrolle der Genexpression in Pflanzen. Die Verwendung von Heterodimeren erlaubt ein breiteres Spektrum von Genkontrollstrategien, und Chemikalien sind bereits zur landwirtschaftlichen Verwendung bekannt, die die rezeptorvermittelte Transaktivierung der Zielgenexpression dieser Klasse auslösen können. Außerdem besitzen Genkontrollstrategien für Pflanzen, die Kernrezeptoren verwenden, die nicht natürlich in Pflanzen auftreten, das attraktive Merkmal der Induzierung nur des genetisch manipulierten Zielgens. Die Klasse II-Rezeptoren allgemein besitzen jedoch relativ schlechte Transkriptionsaktivierungsdomänen, und die Fähigkeit der Rezeptoren zur Transaktivierung von Zielgenen kann durch Addition anderer Transkriptionsaktivierungsdomänen, insbesondere aus pflanzlichen oder viralen Arten, gesteigert werden. Eine weitere Modifikation wäre ebenfalls notwendig, um eine minimale Basisaktivität bereitzustellen, die

schnell auf hohe Werte in Gegenwart einer auslösenden Chemikalie ansteigt. Wie durch die vorliegende Erfindung gezeigt wurde, wurden Rezeptorpolypeptide auf Basis des Klasse II-Modells und die Gene, die sie codieren, entwickelt, die in Pflanzenzellen zur Kontrolle der Expression eines Zielpolypeptids funktionieren, worin die Rezeptorpolypeptide die 5'-regulatorische Region einer Zielexpressionskassette in Gegenwart eines chemischen Liganden aktivieren. Ein solches Verfahren zur Kontrolle der Genexpression an Pflanzen ist nützlich zur Kontrolle verschiedener Merkmale von agronomischer Bedeutung, wie pflanzliche Fruchtbarkeit.

[0007] WO 93/09237 beschreibt verbesserte supersüße Maispflanzen, deren natürlich vorkommenden sh-2- oder bt-2-Gene sowie ein ADP-GDP-Submit-Gen unter der Kontrolle eines heterologen Promotors stehen. Der zum Antreiben des SH-2- oder Bt-2-Gens verwendete heterologe Promotor kann ein induzierbarer Promotor sein, wie ein steroidreaktiver Promotor. Konstrukte, die einen Promotor, der durch den binären Komplex aus dem 20-Hydroxyecdyson-bindenen Protein, funktionsfähig gebunden an die Sh-2- oder Bt-2-Gene, induzierbar ist, und einen Transkriptionsterminator umfassen, werden beschrieben.

[0008] WO 93/23431 beschreibt modifizierte Steroidhormon-Rezeptorproteine und Verfahren zu ihrer Verwendung sowie als molekularer Schalter. Der molekulare Schalter ist aus einem modifizierten Steroidrezeptor zusammengesetzt, der eine natürliche Steroidrezeptor-DNA-Bindungsdomäne einschließt, die an eine modifizierte Ligandenbindungsdomäne an dem Rezeptor gebunden ist. Der molekulare Schalter kann zur Regulierung der Expression in der Gentherapie verwendet werden.

[0009] EP 0589841 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von männlichen sterilen Pflanzen, die nützlich in der Herstellung von Hybridsaatgut sind. Eine erste Pflanze, die mit einer Expressionskassette transformiert ist, die eine Nukleotidsequenz umfaßt, die einen staubbeutelspezifischen Promotor codiert, der funktionsfähig mit einer Nukleotidsequenz verbunden ist, die einen Transaktivator codiert, wird mit einer zweiten Pflanze gekreuzt, die mit einer Expressionskassette transformiert ist, die eine Nukleotidsequenz (die die Vermittlung der Unterbrechung der Bildung lebensfähiger Pollen vermitteln kann) unter der Kontrolle einer Sequenz umfaßt, die durch den Transaktivator aktiviert werden kann.

[0010] Die vorliegende Erfindung ist auf ein Verfahren zur Steuerung der Genexpression in Pflanzen gerichtet. Spezifisch umfaßt das Verfahren das Transformieren einer Pflanze mit wenigstens zwei Rezeptorexpressionskassetten und wenigstens einer Zielexpressionskassette. Die erste Rezeptorexpressionskassette umfaßt eine Nukleotidsequenz für eine 5'-regulatorische Region, die funktionsfähig mit einer 3'-Terminationsregion verbunden ist. Die zweite Rezeptorexpressionskassette umfaßt eine Nukleotidsequenz für eine 5'-regulatorische Region, die funktionsfähig mit einer Nukleotidsequenz verbunden ist, die ein zweites Rezeptorpolypeptid codiert, funktionsfähig verbunden mit einer 3'-Terminationsregion. Die ersten und zweiten Rezeptorpolypeptide umfassen eine erste bzw. zweite Ligandenbindungsdomäne, die gegenseitig verschieden sind. Die Zielexpressionskassette umfaßt eine Nukleotidsequenz für eine 5'-regulatorische Region, die funktionsfähig mit einer Nukleotidsequenz verbunden ist, die eine Zielpolypeptid codiert, funktionsfähig verbunden mit einer 3'-Terminationsregion, worin die 5'-regulatorische Region der Zielexpressionskassette durch die ersten und zweiten Rezeptorpolypeptide in Gegenwart eines oder mehrerer chemischer Liganden aktiviert wird, wodurch die Expression des Zielpolypeptids erreicht wird. Das Verfahren ist nützlich zur Steuerung verschiedener Merkmale von agronomischer Bedeutung, wie zum Beispiel pflanzliche Fruchtbarkeit.

[0011] Die Erfindung ist ferner auf transgene Pflanzen gerichtet, die eine erste und zweite Rezeptorexpressionskassette und eine Zielexpressionskassette umfassen, und solche Rezeptorexpressionskassetten und Zielrezeptorkassetten, die eine hochgradige Expression in Pflanzen ermöglichen, werden hier offenbart.

[0012] Die Rezeptorpolypeptide umfassen eine Ligandenbindungsdomäne, DNA-Bindungsdomäne und eine Transaktivierungsdomäne. Ferner können die Rezeptorpolypeptide eine chimäre Form aufweisen, worin eine oder mehrere der Ligandenbindungs-, DNA-Bindungs- oder Transaktivierungsdomänen aus einer Quelle erhalten werden, die heterolog in bezug auf andere, im chimären Rezeptorpolypeptid vorhandene Domänen ist.

[0013] Fig. 1. Bildliche Darstellung einer Pflanzenzelle, die eine erste Rezeptorexpressionskassette, die ein erstes Rezeptorpolypeptid codiert, das eine erste Ligandenbindungsdomäne umfaßt, und eine zweite Rezeptorexpressionskassette umfaßt, die ein zweites Rezeptorpolypeptid codiert, das eine zweite Ligandenbindungsdomäne umfaßt. Die ersten und zweiten Rezeptorpolypeptide sind gegenseitig verschieden. Die Pflanzenzelle umfaßt ferner eine Zielexpressionskassette, die ein Zielpolypeptid codiert, worin das Zielpolypeptid bei Aktivierung der 5'-regulatorischen Region der Zielexpressionskassette, die einen Promotor mit einem Responsive-Element (RE) umfaßt, durch die ersten und zweiten Rezeptorpolypeptide in Gegenwart eines chemischen Liganden exprimiert wird, der komplementär zur ersten oder zweiten Ligandenbindungsdomäne ist.

[0014] Fig. 2. Bildliche Darstellung einer spezifischen Ausführungsform der Pflanzenzelle aus Fig. 1, worin das erste Rezeptorpolypeptid der Ecdyson-Rezeptor (EcR) ist, das zweite Rezeptorpolypeptid Ultraspiracle (USP) ist, die 5'-regulatorische Region der Zielexpressionskassette ein Ecdyson-Rezeptor-Response-Element (EcRE) umfaßt und der chemische Ligand Tebufenazin ist.

[0015] Fig. 3. Bildliche Darstellung einer spezifischen Ausführungsform der Pflanzenzelle aus Fig. 1, worin das erste Rezeptorpolypeptid eine GAL4-EcR-Fusion ist, das zweite Rezeptorpolypeptid eine USP-VP16-Fusion ist, die 5'-regulatorische Region der Zielexpressionskassette ein GAL4-Response-Element (GAL4RE) umfaßt und der chemische Ligand Tebufenazin ist.

[0016] "Rezeptorpolypeptid", wie hier verwendet, bezeichnet Polypeptide, die die Expression eines Zielpolypeptids als Reaktion auf einen eingesetzten chemischen Liganden aktivieren. Das Rezeptorpolypeptid umfaßt eine Ligandenbindungsdomäne, eine DNA-Bindungsdomäne und eine Transaktivierungsdomäne. Eine "Rezeptorexpressionskassette" umfaßt eine Nukleotidsequenz für eine 5'-regulatorische Region, die funktionsfähig mit einer Nukleotidsequenz verbunden ist, die ein Rezeptorpolypeptid codiert, und eine untranslatierte 3'-Terminationsregion (Stoppcodon und Polyadenylierungssequenz).

[0017] Die Ligandenbindungsdomäne umfaßt eine Sequenz aus Aminosäuren, deren Struktur nicht-kovalent einen komplementären chemischen Liganden bindet. Daher bilden eine Ligandenbindungsdomäne und ihr chemischer Ligand ein komplementäres Bindungspaar.

[0018] Die DNA-Bindungsdomäne umfaßt eine Sequenz aus Aminosäuren, die nicht kovalent eine als Response-Element (RE) bekannte spezifische Nukleotidsequenz bindet. Die Response-Elemente befinden sich in der 5'-regulatorischen Region der Zielexpressionskassette und umfassen ein Paar von Halbstellen, wobei jede Halbstelle einen Kern aus 6 Basenpaaren aufweist, worin eine einzelne DNA-Bindungsdomäne eine einzelne Halbstelle erkennt. Die Halbstellen können in relativer linearer Orientierung zueinander als ihre direkten Repeats, palindromischen Repeats oder invertierten Repeats angeordnet sein. Ein Response-Element bindet entweder ein Homodimer oder Heterodimer von Rezeptorpolypeptiden. Die Nukleotidsequenz und lineare Orientierung der Halbstellen bestimmt, welche DNA-Bindungsdomäne oder DNA-Bindungsdomänen ein komplementäres Bindungspaar mit dem Response-Element bilden wird/werden, sowie die Fähigkeit von Rezeptorpolypeptiden zur Wechselwirkung miteinander in einem Dimer.

[0019] Die Transaktivierungsdomäne umfaßt eine oder mehrere Sequenzen von Aminosäuren, die als Subdomänen wirken, die die Funktion von Transkriptionsfaktoren während der Vorinitiierung und des Zusammenbaus an der TATA-Box beeinflussen. Die Wirkung der Transaktivierungsdomäne besteht darin, wiederholte Transkriptionsstartereignisse zu erlauben, was zu größeren Graden der Genexpression führt.

[0020] Eine "Einheit" bezeichnet den Teil oder Anteil eines Rezeptorpolypeptids, der aus der angegebenen Quelle stammt. Zum Beispiel bezeichnet "EcR-Einheit" den Anteil des Rezeptorpolypeptids, der aus dem nativen Ecdyson-Rezeptor abgeleitet wurde. Einheit, wie hier verwendet, kann eine oder mehrere Domänen umfassen.

[0021] "Homolog" wird verwendet um anzuzeigen, daß ein Rezeptorpolypeptid den gleichen natürlichen Ursprung in bezug auf seinen derzeitigen Wirt hat. Zum Beispiel wird der Ecdyson-Rezeptor (EcR) in bestimmten Insektenarten gefunden und soll homolog in bezug auf die Insektenart sein, aus der er entstammt. "Homolog" wird ebenfalls verwendet um anzuzeigen, daß eine oder mehrere der in einem Rezeptorpolypeptid vorhandenen Domänen den gleichen natürlichen Ursprung in bezug zueinander haben. Zum Beispiel werden die DNA-Bindungsdomäne und die Ligandenbindungsdomäne von EcR als von homologem Ursprung in bezug zueinander betrachtet.

[0022] "Heterolog" wird verwendet um anzuzeigen, daß ein Rezeptorpolypeptid einen unterschiedlichen natürlichen Ursprung in bezug auf seinen derzeitigen Wirt hat. Falls zum Beispiel der Ecdyson-Rezeptor (EcR) aus einer Insektenart in einer Pflanzenzelle exprimiert wird, dann wird der EcR als heterolog in bezug auf seinen derzeitigen Wirt beschrieben, der die Pflanzenzelle ist. "Heterolog" wird ebenfalls verwendet um anzuzeigen, daß eine oder mehrere der in einem Rezeptorpolypeptid vorhandenen Domänen sich in ihrem natürlichen Ursprung in bezug auf andere vorhandene Domänen unterscheiden. Falls zum Beispiel die Transaktivierungsdomäne aus dem Herpes simplex VP16-Protein mit dem USP-Rezeptor aus Drosophila fusioniert wird, dann ist die VP16-Transaktivierungsdomäne heterolog in bezug auf die USP-Einheit. Falls weiterhin eine Domäne aus USP mit einer Domäne aus RXR fusioniert wird, um einen funktionellen Rezeptor herzustellen, dann würde die chimäre Fusion Domänen aufweisen, die heterolog zueinander sind. Zusätzlich würde ein heterologes Re-

zeptorpolypeptid, das die Fusion aus einer VP16-Transaktivierungsdomäne und einer USP-Einheit umfaßt, bei Expression in einer Pflanze als heterolog in bezug auf den pflanzlichen Wirt betrachtet.

[0023] Der Begriff "chimär" wird verwendet um anzuzeigen, daß das Rezeptorpolypeptid Domänen umfaßt, von denen wenigstens eine einen Ursprung aufweist, der heterolog in bezug auf die anderen vorhandenen Domänen ist. Diese chimären Rezeptorpolypeptide werden durch Nukleotidsequenzen codiert, die zusammen fusioniert oder ligiert wurden, was zu einer codierenden Sequenz führt, die nicht natürlich vorkommt.

[0024] Die erfindungsgemäßen chimären Rezeptorpolypeptide werden durch eine lineare Nomenklatur vom N-terminalen zum C-terminalen Teil des Polypeptids numeriert. Unter Verwendung dieser Nomenklatur würde ein chimäres Rezeptorpolypeptid mit der an das N-terminale Ende des USP-Rezeptors fusionierten Transaktivierungsdomäne aus VP16 als VP16-USP bezeichnet. Falls umgekehrt VP16 an den C-Terminus des USP-Rezeptors fusioniert wäre, dann würde das chimäre Rezeptorpolypeptid als USP-VP16 bezeichnet.

[0025] Genkonstruktionen werden durch eine 5'-regulatorische Region und ihre funktionsfähig verbundene codierende Sequenz benannt, worin die 5'-regulatorische Region vor einem Schrägstrich (/) angegeben wird und die codierende Sequenz nach dem Schrägstrich angegeben wird. Zum Beispiel bezeichnet die Genkonstruktion 35S/USP-VP16 den 35S-Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus, fusioniert an den chimären Rezeptor USP-VP16, worin die Transaktivierungsdomäne von VP16 an das C-terminale Ende von USP fusioniert ist.

[0026] Eine "Zielexpressionskassette" umfaßt eine Nukleotidsequenz für eine 5'-regulatorische Region, die funktionsfähig mit einer Nukleotidsequenz verbunden ist, die ein Zielpolypeptid codiert, dessen Expression durch die Rezeptorpolypeptide in Gegenwart eines chemischen Liganden aktiviert wird. Die 5'-regulatorische Region des Zielgens umfaßt eine Kernpromotorsequenz, eine Transkriptionsstartsequenz und das Response-Element oder die Response-Elemente, die zur komplementären Bindung der Rezeptorpolypeptide notwendig sind. Die Zielexpressionskassette besitzt ebenfalls eine 3'-Terminationsregion (Stoppcodon und Polyadenylierungssequenz).

[0027] Das erfindungsgemäße Verfahren umfaßt das Exprimieren, innerhalb einer Pflanze, von wenigstens zwei Rezeptorpolypeptiden, die in Gegenwart eines oder mehrerer chemischer Liganden die 5'-regulatorische Region einer Zielexpressionskassette innerhalb einer transgenen Pflanze aktivieren (**Fig. 1**). Wenigstens zwei Rezeptorpolypeptide sind erforderlich, um die 5'-regulatorische Region zu aktivieren. Diese zwei Rezeptorpolypeptide bilden ein Dimer. Wenn die zwei Rezeptorpolypeptide identisch sind, bilden sie ein "Homodimer", und wenn die zwei Rezeptorpolypeptide verschieden sind, bilden sie ein "Heterodimer". Eines oder beide der zwei in einem Homodimer oder Heterodimer vorhandenen Rezeptorpolypeptide können in einer chimären Form sein, wie nachfolgend beschrieben. Beispiele für Heterodimere, die von der Erfindung umfaßt werden, schließen ein (aber sind nicht beschränkt auf) EcR+USP, EcR+RXR oder chimäre Formen davon.

[0028] Die Rezeptorpolypeptide umfassen eine Ligandenbindungsdomäne, eine DNA-Bindungsdomäne und eine Transaktivierungsdomäne. Die DNA-Bindungsdomäne bindet das Rezeptorpolypeptid an die 5'-regulatorische Region der Zielexpressionskassette am Ort des Response-Elements. Die Ligandenbindungsdomäne der Rezeptorpolypeptide bindet, wenn sie vorhanden ist, den komplementären chemischen Liganden. Die Bindung des chemischen Liganden verursacht eine Konformationsveränderung im Rezeptorpolypeptid und erlaubt es der Transaktivierungsdomäne, die Transkription der codierenden Sequenz der Zielexpressionskassette zu beeinflussen, was zur Herstellung des Zielpolypeptids führt.

[0029] Die in der vorliegenden Erfindung verwendeten chimären Rezeptorpolypeptide besitzen eine oder mehrere Domänen, die aus einer heterologen Quelle erhalten werden. Die Verwendung von chimären Rezeptorpolypeptiden hat den Vorteil der Kombination von Domänen aus unterschiedlichen Quellen, wodurch ein Rezeptorpolypeptid bereitgestellt wird, das durch eine Auswahl chemischer Liganden aktiviert wird und überlegene Ligandenbindungs-, DNA-Bindungs- und Transaktivierungseigenschaften besitzt. Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind chimäre Rezeptorpolypeptide, worin der komplementäre chemische Ligand aus einem Insektizid, einem Insektenhormon oder Antagonisten oder Agonisten von Insektenhormonen ausgewählt ist.

[0030] Die 5'-regulatorische Region der Rezeptorexpressionskassetten umfaßt ferner einen Promotor, der die Expression in Pflanzengeweben und Zellen erlaubt. Geeignete Promotoren werden für die Rezeptorexpressionskassetten ausgewählt, so daß die Expression der Rezeptorpolypeptide konstitutiv, entwicklungsmäßig reguliert, gewebespezifisch, zellspezifisch oder zellkompartimentspezifisch sein kann. Promotoren können

ebenfalls so ausgewählt werden, daß die Expression der Rezeptorpolypeptide selbst in der Pflanze chemisch induziert sein kann, wodurch der Grad der Promotorinduktion durch den Liganden erhöht wird. Durch Kombination von Promotorelementen, die eine spezifische Expression verleihen, mit denjenigen, die eine chemisch induzierte Expression verleihen, können die Rezeptorpolypeptide innerhalb spezifischer Zellen oder Gewebe der Pflanze als Reaktion auf eine chemische Anwendung exprimiert oder aktiviert werden. Die Nukleotidsequenz, die das Rezeptorpolypeptid codiert, kann für eine verbesserte Expression in Pflanzen, eine verbesserte Funktionalität oder beides modifiziert werden. Solche Modifikationen schließen ein, aber sind nicht beschränkt auf eine Veränderung der Codonverwendung, Insertion von Introns oder Schaffung von Mutationen, bevorzugt in der Ligandenbindungsdomäne. In einer Ausführungsform der Erfindung werden Expressionskassetten, die einen staubbeutelspezifischen oder stempelspezifischen Promotor umfassen, der funktionsfähig mit einer Nukleotidsequenz verbunden ist, die ein chimäres Rezeptorpolypeptid codiert, zur Aktivierung der Expression eines Zielpolypeptids verwendet.

[0031] Zielpolypeptide, deren Expression durch die Rezeptorpolypeptide in Gegenwart eines chemischen Liganden aktiviert wird, werden ebenfalls offenbart. Die Expression jeder codierenden Sequenz kann durch die vorliegende Erfindung gesteuert werden, vorausgesetzt, der Promotor, der funktionsfähig mit der codierenden Sequenz verbunden ist, wurde manipuliert, so daß er das Response-Element oder die Response-Elemente enthält, die komplementär zur DNA-Bindungsdomäne der verwendeten Rezeptorpolypeptide sind. Zum Beispiel werden Zielpolypeptide, die nützlich zur Steuerung von pflanzlicher Fruchtbarkeit sind, durch die Rezeptorpolypeptide in Gegenwart eines chemischen Liganden aktiviert.

[0032] Chimäre Rezeptorpolypeptide können in der vorliegenden Erfindung zur Aktivierung der Expression eines Zielpolypeptids verwendet werden. Eine oder mehrere der drei Domänen eines Rezeptorpolypeptids können aus einer heterologen Quelle auf Basis ihrer Wirksamkeit zur Transaktivierung, DNA-Bindung oder chemischen Ligandenbindung ausgewählt werden. Die Domänen des chimären Rezeptorpolypeptids können ebenfalls aus jedem Organismus, wie Pflanzen, Insekten und Säugetiere, erhalten werden, der ähnliche transkriptionsregulierende Funktionen aufweist. In einer Ausführungsform der Erfindung sind diese Domänen aus anderen Mitgliedern der Steroid- und Thyroidhormon-Superfamilie von Kernrezeptoren ausgewählt. Chimäre Rezeptorpolypeptide, wie hier beschrieben, bieten den Vorteil der Kombination von optimaler Transaktivierungsaktivität, komplementärer Bindung eines ausgewählten chemischen Liganden und Erkennung eines spezifischen Response-Elements. Deshalb kann ein chimäres Polypeptid konstruiert werden, das für einen spezifischen Zweck maßgeschneidert ist. Diese chimären Rezeptorpolypeptide stellen ebenfalls eine verbesserte Funktionalität in der heterologen Umgebung einer Pflanzenzelle bereit.

[0033] In Verfahren der Erfindung können die Transaktivierungs-, Ligandenbindungs- und DNA-Bindungsdomänen im chimären Rezeptorpolypeptid in jeder funktionellen Anordnung zusammengesetzt werden. Wenn zum Beispiel eine Subdomäne einer Transaktivierungsdomäne am N-terminalen Teil eines natürlich vorkommenden Rezeptors gefunden wird, dann kann das chimäre Rezeptorpolypeptid der vorliegenden Erfindung eine Transaktivierungssubdomäne am C-Terminus anstelle oder zusätzlich zu einer Subdomäne am N-Terminus einschließen. Chimäre Rezeptorpolypeptide wie hier offenbart, können ebenfalls multiple Domänen des gleichen Typs aufweisen, zum Beispiel mehr als eine Transaktivierungsdomäne (oder zwei Subdomänen) pro Rezeptorpolypeptid.

[0034] Die Ligandenbindungsdomäne des Rezeptorpolypeptids stellt das Mittel bereit, durch das die 5'-regulatorische Region der Zielexpressionskassette als Reaktion auf Gegenwart eines chemischen Liganden aktiviert wird. Der Ecdyson-Rezeptor (EcR) aus Drosophila ist ein Beispiel für ein Rezeptorpolypeptid, worin komplementäre chemische Liganden identifiziert wurden, die an die Ligandenbindungsdomäne binden. Das Steroidhormon Ecdyson löst Koordinationsveränderungen in der Gewebeentwicklung aus, die zu Metamorphose führt, und es wurde gezeigt, das Ecdyson an EcR bindet. Koelle et al., Cell 67: 59–77, 1991. Das in Pflanzen erzeugte Analogon von Ecdyson, Muristeron, bindet ebenfalls an die Ligandenbindungsdomäne von EcR. Andere Chemikalien, wie die nicht-steroidalen Ecdyson-Agonisten RH5849 (Wing, Science 241: 467–469 (1988)) und Tebufenozid, letzteres als das Insektizid MIMIC® bekannt, werden ebenfalls als chemischer Ligand für die Ligandenbindungsdomäne con EcR wirken. Es wurde in der vorliegenden Erfindung festgestellt, daß der EcR und seine Ligandenbindungsdomäne besonders nützlich zur Steuerung der Zielpolypeptidexpression in Pflanzenzellen sind, wie nachfolgend in den Beispielen beschrieben.

[0035] Ein anderer Rezeptor aus Drosophila, Ultraspiracle (USP), ebenfalls als "2C" bekannt, wurde isoliert und kloniert, und seine Ligandenbindungsdomäne wurde identifiziert (Henrich et al., Nucleic Acids Research 18; 4143–4148 (1990)). USP ist höchst ähnlich dem Steroidrezeptor RXRα, der einen chemischen Liganden 9-cis-Retinolsäure aufweist. Es wurde gezeigt, daß USP ein Heterodimer mit EcR bildet und die Expression

eines Zielpolypeptids in transformierten Mäusenierenzellen als Reaktion auf die Anwendung von Ecdyson reguliert (Evans et al., WO 94/01558). Es wurde gefunden, daß der Rezeptor USP und seine Ligandenbindungsdomäne in der vorliegenden Erfindung besonders nützlich zur Steuerung der Zielpolypeptidexpression in Pflanzen sind, wie nachfolgend in den Beispielen beschrieben.

[0036] Ligandenbindungsdomänen zur Konstruktion von chimären Rezeptorpolypeptiden können ebenfalls aus einer Vielzahl anderer Quellen erhalten werden. Besonders nützliche Quellen für Ligandenbindungsdomänen schließen ein (aber sind nicht beschränkt auf) Klasse II-Rezeptorproteine der Steroid- und Thyroidhormon-Superfamilie von Kernrezeptoren.

[0037] Die Wahl des chemischen Liganden wird davon abhängen, welche Ligandenbindungsdomänen im Rezeptorpolypeptid vorhanden sind. Jede chemische Verbindung wird ausreichen, solange gezeigt wird, daß sie ein komplementäres Bindungspaar mit der gewählten Ligandenbindungsdomäne bildet. Wenn eine natürlich vorkommende Verbindung dafür bekannt ist, ein komplementäres Bindungspaar mit einer besonderen Ligandenbindungsdomäne zu bilden, dann finden diese bekannten Verbindungen ebenfalls Verwendung in der vorliegenden Erfindung. Besonders nützliche Quellen für Ligandenbindungsdomänen schließen ein (aber sind nicht beschränkt auf) Klasse II-Rezeptorproteine der Steroid- und Thyroidhormon-Superfamilie von Kernrezeptoren. Besonders nützliche Chemikalien schließen ein (aber sind nicht beschränkt auf) Insektizide, die ein komplementäres Bindungspaar mit der Ligandenbindungsdomäne bilden. Solche Chemikalien schließen ein (aber sind nicht beschränkt auf) Hormone, Hormonagonisten oder Hormonantagonisten, deren Funktion als Insektizide ihrer Bindung an native Rezeptorproteine in Insekten zugeschrieben werden kann. Zusätzlich besitzen Chemikalien mit diesen Hormon- oder hormonbezogenen Eigenschaften, die als Insektizide bekannt sind, den zusätzlichen Vorteil, daß sie bereits für die landwirtschaftliche Produktion untersucht wurden, was solche Chemikalien "gebrauchsfertig" für die Feldausbringung auf Kulturpflanzen macht. Nützliche Chemikalien mit diesen Eigenschaften schließen ein (aber sind nicht beschränkt auf) Fenoxycarb, CGA 59,205, Tebufenazin und RH 5849.

[0038] Die Erfindung umfaßt ebenfalls Wege zur Reduzierung des Hintergrundes, so daß die Induktion relativ zur unterdrückten Hintergrundexpression hoch ist. Viele Ligandenbindungsdomänen werden ein komplementäres Bindungspaar mit mehr als einem chemischen Liganden bilden. In einigen Fällen werden diese chemischen Liganden binden, aber besitzen keine bekannte Funktion. In anderen Fällen gibt es chemische Liganden, die endogen gegenüber dem derzeitigen Wirt sind, in dem die Rezeptorpolypeptide exprimiert werden, die an die Ligandenbindungsdomäne binden werden. Zur Vermeidung der Bindung endogener chemischer Liganden in einem heterologen Wirt mit den exprimierten Rezeptorpolypeptiden und zur Vermeidung der unbeabsichtigten Beeinflussung der Expression des Zielgens kann es wünschenswert sein, die codierende Sequenz für das Rezeptorpolypeptid zu mutieren, so daß es nur den exogen verwendeten chemischen Liganden erkennt. Nützliche Verfahren der Mutagenese sind fachbekannt, wie chemische Mutagenese oder ortsgerichtete Mutagenese.

[0039] In einem Verfahren werden mutierte Rezeptorpolypeptide durch PCR-Mutagenese der Nukleotidsequenz hergestellt, die die Ligandenbindungsdomäne von EcR oder USP codiert. Diese mutierten Rezeptorpolypeptide werden in einem Wirtsorganismus exprimiert, der sich selbst für zweckmäßige Durchmusterungs- und Isolierungstechniken anbietet, wie Hefe. Die Durchmusterung auf mutierte Rezeptorpolypeptide, die eine verringerte Basisaktivität und eine stärker vervielfachte Induktion in einem solchen Wirtsorganismus aufweisen, wird jedoch nur Kandidaten zur weiteren Untersuchung in Pflanzenzellen liefern, da es aus der Arbeit mit dem Glukokortikoidrezeptor (GR) ersichtlich ist, daß sie nicht voraussagend für die Funktionalität in transgenen Pflanzen ist, auch wenn Rezeptoren aus der Steroid- und Thyroidhormon-Superfamilie in Hefe funktionieren können (Lloyd et al., Science 226: 436 (1994)). Weiter beschränkend für die Anwendung der Ergebnisse aus Hefe ist die Beobachtung, daß Hefezellen, die GR exprimieren, nicht auf den üblicherweise verwendeten chemischen Liganden Dexamethason reagieren, obwohl dieser Ligand funktionell in anderen heterologen Systemen ist (Schena et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10421–10425 (1991)).

[0040] Eine weitere Untersuchung in Pflanzenzellen wird durch Herstellung von Rezeptorexpressionskassetten, die die mutierten Rezeptorpolypeptide codieren, und ihr Transformieren in Pflanzenzellen in Kombination mit einer Zielexpressionskassette erreicht. Die transformierten Pflanzenzellen werden auf Aktivierung der 5'-regulatorischen Region der Zielexpressionskassette durch die mutierten Rezeptorpolypeptide in Gegenwart eines geeigneten chemischen Liganden untersucht. Mutierte Rezeptorpolypeptide, die eine niedrige Basisexpression eines Zielpolypeptids in Abwesenheit eines chemischen Liganden und eine hohe Expression von Zielpolypeptid in Gegenwart eines geeigneten chemischen Liganden erzeugen, sind nützlich zur Steuerung der Genexpression in Pflanzen.

[0041] Außerdem kann die Heterodimerisierung in Abwesenheit von Ligand ebenfalls zu unbeabsichtigter Aktivierung der 5'-regulatorischen Region der Zielexpressionskassette führen, wodurch hohe Grade an Basisexpression des Zielpolypeptids erzeugt werden. Von einer anderen Region der Ligandenbindungsdomäne, bekannt als Heptad-Repeat-Region, wird angenommen, daß sie den Grad der Heterodimerisierung in Abwesenheit von Ligand beeinflußt (Au-Fliegner et al., Mol. Cell. Biol. 13: 5725 (1993)). In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird der neunte Heptad-Repeat der Heptad-Repeat-Region unter Verwendung von ortsgerichteter PCR-Mutagenese in einer solchen Weise mutiert, daß die Wechselwirkung zwischen Untereinheiten der Rezeptorpolypeptidheterodimere in Abwesenheit von chemischem Ligand verändert wird.

[0042] Die DNA-Bindungsdomäne ist eine Sequenz von Aminosäuren, die bestimmte funktionelle Merkmale aufweist, die verantwortlich sind für die Bindung des Rezeptorpolypeptids an eine spezifische Sequenz von Nukleotiden, die Response-Elemente, die in der 5'-regulatorischen Region der Zielexpressionskassette vorhanden sind. In einer Ausführungsform der Erfindung wird die DNA-Bindungsdomäne aus einem Klasse II-Kernrezeptor erhalten und enthält in einer Weise angeordnete Cysteinresten, so daß sie bei Koordination mit Zinkionen das sogenannte "Zinkfinger"-Motiv bilden. Die Struktur von DNA-Bindungsdomänen für die Klasse II-Kernrezeptoren ist hoch konserviert von einer Art zur anderen, und entsprechend gibt es eine beschränkte Variation in den Response-Elementen, die zur Bildung eines komplementären Bindungspaars verwendet werden. (Evans, Science 240: 889–895 (1988)). Dennoch kann eine beträchtliche Flexibilität in das Verfahren zur Steuerung der Genexpression eingeführt werden, indem diese konservierten Response-Elemente in anderen weisen verwendet werden. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden multiple Kopien und bevorzugt 1 bis 11 Kopien des angemessenen Response-Elements in die 5'-regulatorische Region plaziert, die mehrfache Orte zur Bindung von Rezeptorpolypeptidheterodimeren erlaubt, was zu einem größeren Aktivierungsgrad führt.

[0043] Eine weitere Flexibilität im Genkontrollverfahren kann durch Veränderung der linearen Orientierung oder Position der Response-Elemente in der 5'-regulatorischen Region erreicht werden. Die Response-Elemente, die durch Klasse II-Rezeptorproteine erkannt werden, besitzen eine "Dyaden"-Symmetrie, was mit ihrer Funktion mit dimerisierten Rezeptorpolypeptiden zur Steuerung der Genexpression übereinstimmt. (Evans, Science 240: 889–895 (1988)). Daher bindet ein Rezeptorpolypeptiddimer an eine "Gesamtstelle", wobei jedes Rezeptorpolypeptid individuell an eine "Halbstelle" bindet. Außerdem können diese "Halbstellen" entweder in einer direkten Repeat-, invertierten Repeat- oder palindromischen Weise orientiert sein. Die nativen EcR- und USP-Rezeptorpolypeptide erkennen ein palindromisches Response-Element, anders als die meisten Klasse II-Rezeptorproteine, die direkte Repeat-Response-Elemente mit geeignetem Abstand erkennen.

[0044] Eine zusätzliche Flexibilität in der Steuerung der Genexpression durch die vorliegende Erfindung kann durch Verwendung von DNA-Bindungsdomänen und Response-Elemente aus anderen Transkriptionsaktivatoren erhalten werden, die LexA- oder GAL4-Proteine einschließen (aber nicht darauf beschränkt sind). Die DNA-Bindungsdomäne aus dem LexA-Protein, codiert durch das LexA-Gen aus E. coli, und sein komplementärer Bindungsort (Brent und Ptashne, Cell 43: 729–736 (1985), die einen LexA/GAL4-Transkriptionsaktivator beschreiben) können verwendet werden. Eine weitere nützliche Quelle ist aus dem GAL4-Protein von Hefe (Sadowski et al., Nature 335: 563–564, 1988, die einen GAL4-VP16-Transkriptionsaktivator beschreiben). In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird ein chimäres Rezeptorpolypeptid durch Fusionieren der GAL4-DNA-Bindungsdomäne an eine Einheit konstruiert, die die Ligandenbindungsdomäne aus EcR enthält, das bei Heterodimerisierung mit USP oder einer USP-Einheit die Expression eines Zielpolypeptids steuern kann.

[0045] Ein noch weiterer Grad an Flexibilität in der Steuerung der Genexpression kann durch Kombination von Response-Elementen, die komplementäre Bindungspaare bilden, mit DNA-Bindungsdomänen aus unterschiedlichen Typen von Transkripitionsaktivatoren erhalten werden, d. h. unter Verwendung überlappender Response-Elemente aus GAL4 und eines Mitglieds der Steroid- und Thyroidhormon-Superfamilie von Kernrezeptoren. Ein Beispiel ist die 5'-regulatorische Region einer Zielexpressionskassette, die das Response-Element aus GAL4 umfaßt und mit dem Response-Element von T3R überlappt. Wenn T3R-Proteine in Abwesenheit eines chemischen Liganden homodimerisieren, werden sie ihr eigenes Response-Element erkennen und daran binden, wodurch das benachbarte Response-Element für GAL4 blockiert wird. Es gibt keine Aktivierung der 5'-regulatorischen Region der Zielexpressionskassette in dieser Situation. Bei Addition eines komplementären Liganden für T3R wird das Homodimer getrennt und aus seinem Response-Element freigesetzt, wodurch das benachbarte Response-Element für GAL4 demaskiert wird. Sobald es demaskiert ist, können die chimären Rezeptorpolypeptide, die die DNA-Bindungsdomäne aus GAL4 verwenden, an das Response-Element unter geeigneten Dimerisierungsbedinungen binden und dadurch die Expression des Zielpolypeptids aktivieren.

[0046] Transaktivierungsdomänen können als Aminosäuresequenzen definiert werden, die bei Kombination mit der DNA-Bindungsdomäne in einem Rezeptorpolypeptid den produktiven Transkriptionsstart durch RNA-Polymerasen erhöhen (siehe allgemein Ptashne, Nature 335: 683–689 (1988)). Es ist bekannt, daß unterschiedliche Transaktivierungsdomänen unterschiedliche Effektivitätsgrade in ihrer Fähigkeit zur Erhöhung des Transkriptionsstarts haben. In der vorliegenden Erfindung ist es wünschenswert, Transaktivierungsdomänen zu verwenden, die eine überlegene Transaktivierungswirksamkeit in Pflanzenzellen haben, um einen hohen Grad der Zielpolypeptidexpression in Pflanzen als Reaktion auf die Gegenwart eines chemischen Liganden zu erzeugen. Transaktivierungsdomänen, von denen gezeigt wurde, daß sie besonders wirksam im Verfahren der vorliegenden Erfindung sind, schließen ein (aber sind nicht beschränkt auf) VP16 (isoliert aus dem Herpes simplex-Virus) und C1 (isoliert aus Mais). In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Transaktivierungsdomäne aus VP16 an eine USP-Einheit zur Verwendung als ein Monomer eines Rezeptorpolypeptidheterodimers zur Steuerung der Zielpolypeptidexpression in Pflanzen fusioniert. Eine weitere bevorzugte Ausführungsform ist die Fusion der Transaktivierungsdomäne aus C1 an eine EcR-Einheit als ein Monomer. Andere Transaktivierungsdomänen können ebenfalls effektiv sein.

[0047] Wie oben beschrieben wurde, kann das erfindungsgemäße Verfahren zur Erhöhung der Genexpression gegenüber einem minimalen Basisniveau verwendet werden. Einer der herausragenden Vorzüge des vorliegenden Verfahrens ist jedoch, daß es ebenfalls zur Verringerung oder Hemmung der Genexpression verwendet werden kann, d. h. zur Genrepression. Repression kann durch die Bildung von Homodimeren erreicht werden, wenn die Halbstellen des Response-Elements eine lineare Orientierung haben, die unterschiedlich von der linearen Orientierung ist, die die Heterodimerbindung erlaubt. Unter diesen Bedingungen unterdrücken Homodimere, die an die 5'-regulatorische Region der Zielexpressionskassette gebunden sind, die Genexpression, das sie mit dem Transkriptionsprozeß wechselwirken. Deshalb kann die Genrepression durch Einschluß eines Response-Elements oder von Response-Elementen, die die Homodimerbindung erlauben, in der 5'-regulatorischen Region erreicht werden. In einer Ausführungsform der Erfindung wird die Genrepression durch Bindung eines Homodimers von USP oder EcR an die 5'-regulatorische Region einer Zielexpressionskassette erreicht, die eine komplementäre direkte Repeat-Halbstelle umfaßt.

[0048] Genrepression, die durch Homodimerbindung verursacht wird, würde durch Addition eines chemischen Liganden freigegeben, der die Heterodimerisierung auslöst. Diese Heterodimerisierung aktiviert dann die 5'-regulatorische Region der Zielexpressionskassette. Zum Beispiel wird die Expression des Zielpolypeptids in einer transgenen Pflanze unterdrückt werden, die USP- und EcR-Rezeptorpolypeptide exprimiert und eine Zielexpressionskassette umfaßt, die sowohl ein palindromisches Halbstellen-Response-Element als auch ein direktes Repeat- (oder invertiertes Repeat-) Halbstellen-Response-Element aufweist, das komplementär zur DNA-Bindungsdomäne von USP und EcR ist. In Gegenwart von Tebufenozid oder eines anderen chemischen Liganden, der an die Ligandenbindungsdomäne von EcR oder USP oder beide bindet, erfolgt eine Heterodimerisierung mit USP und anschließende Bindung an das andere vorhandene Response-Element, was wiederum zur Aktivierung der 5'-regulatorischen Region der Zielexpressionskassette führt. Deshalb würde die Repression der Zielexpressionskassette freigegeben werden.

[0049] Zur Expression in Pflanzen müssen geeignete Promotoren sowohl für die Rezeptorexpressionskassetten als auch für die Zielexpressionskassette ausgewählt werden. Wenn nichts anderes spezifisch angegeben ist, können die nachfolgend erörterten Promotoren zur direkten Expression entweder der Rezeptorpolypeptide oder des Zielpolypeptids in Pflanzen verwendet werden. Diese Promotoren schließen ein (aber sind nicht beschränkt auf) konstitutive, induzierbare, zeitlich regulierte, entwicklungsmäßig regulierte, chemisch regulierte, gewebebevorzugte und gewebespezifische Promotoren. Bevorzugte konstitutive Promotoren schließen ein (aber sind nicht beschränkt auf) die CaMV 35S- und 19S-Promotoren (US-PS 5 352 605). Zusätzlich bevorzugte Promotoren schließen ein (aber sind nicht beschränkt auf) eines oder mehrerer der Actingene, die dafür bekannt sind, in den meisten Zelltypen exprimiert zu werden. Der von McElroy et al. beschriebene Promotor, Mol. Gen. Genet. 231: 150–160 (1991), kann leicht in die Rezeptorexpressionskassetten zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung eingeführt werden, und er ist besonders geeignet zur Verwendung in einkeimblättrigen Wirten. Noch ein weiterer bevorzugter konstitutiver Promotor stammt aus Ubiquitin, das ein anderes Genprodukt ist, das für die Anreicherung in vielen Zelltypen bekannt ist. Der Ubiquitinpromotor wurde aus mehreren Arten zur Verwendung in transgenen Pflanzen kloniert (z. B. Sonnenblume – Binet et al., Plant Science 79: 87–94 (1991); Mais – Christensen et al., Plant Molec. Biol. 12: 619–632 (1989)). Der Mais-Ubiquitinpromotor wurde in transgenen einkeimblättrigen Systemen entwickelt, und seine Sequenz und Vektoren, die zur Transformation von einkeimblättrigen Pflanzen konstruiert wurden, werden in EP-342 926 offenbart. Der Ubiquitinpromotor ist geeignet zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung in transgenen Pflanzen, speziell in einkeimblättrigen. Weitere nützliche Promotoren sind die U2- und U5-snRNA-Promotoren aus Mais (Brown et al., Nucleic Acids Res. 17: 8991 (1989)) und der Promotor aus Alkoholdehydrogenase (Dennis et al., Nucleic Acids

Res. 12: 3983 (1984)).

[0050] Gewebespezifische oder gewebebevorzugte Promotoren, die in der vorliegenden Erfindung in Pflanzen nützlich sind, insbesondere in Mais, sind diejenigen, die die Expression in Wurzel, Mark, Blättern oder Pollen ausrichten. Solche Promotoren werden in WO 93/07278 offenbart. Ebenfalls nützlich sind Promotoren, die eine samenspezifische Expression verleihen, wie diejenigen, die offenbart werden von Schemthaner et al., EMBO J. 7: 1249 (1988); die staubbeutelspezifische Promotoren ant32 und ant43D, offenbart in EP-A-578 611; der staubbeutel-(tapetal)-spezifische Promotor B6 (Huffman et al., J. Cell. Biochem. 17B: Abstract #D209 (1993)); stempelspezifische Promotoren, wie ein modifizierter S13-Promotor (Dzelkains et al., Plant Cell 5: 855 (1993)).

[0051] Ebenfalls nützlich in der vorliegenden Erfindung sind chemisch induzierte Promotoren. Besondere Promotoren in dieser Kategorie, die zur Ausrichtung der Expression der Rezeptorpolypeptide oder des Zielpolypeptids in Pflanzen nützlich sind, werden z. B. in EP-A-332 104 offenbart.

[0052] Die 5'-regulatorische Region entweder der Rezeptorexpressionskassette oder der Zielexpressionskassette kann ebenfalls andere steigernde Sequenzen einschließen. Es wurde festgestellt, daß zahlreiche Sequenzen die Genexpression in transgenen Pflanzen steigern. Zum Beispiel sind eine Anzahl von nicht-translatierten Leitsequenzen, die aus Viren stammen, dafür bekannt, die Expression zu steigern. Spezifisch wurde gezeigt, daß die Leitsequenzen aus dem Tabakmosaikvirus (TMV, die "Ω-Sequenz"), aus dem chlorotischen Maisscheckungsvirus (MCMV) und aus dem Luzernemosaikvirus (AMV) effektiv in der Steigerung der Expression sind (z. B. Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15: 8693–8711 (1987); Skuzeski et al., Plant Molec. Biol. 15: 65–79 (1990)). Andere fachbekannte Leitsequenzen schließen ein, aber sind nicht beschränkt auf:

– Picornavirus-Leitsequenzen, zum Beispiel EMCV-Leitsequenz (Encephalomyocarditis 5'-nicht-codierende Region) (O. Elroy-Stein, T. R. Fuerst und B. Moss, PNAS USA 86: 6126–6130 (1989));
– Potyvirus-Leitsequenzen, zum Beispiel TEV-Leitsequenz (Tabakätzvirus) (Allison et al., (1986)); MDMV-Leitsequenz (Maiszwergmosaikvirus); Virology, 154: 9–20);
– Leitsequenz des Bindungsproteins (BiP) der schweren Kette von Humanimmunglobulin (D. G. Macejak und P. Samow, Nature 353: 90–94 (1991));
– untranslatierte Leitsequenz aus der Hüllprotein-mRNA des Luzernemosaikvirus (AMV RNA 4) (S. A. Jobling und L. Gehrke, Nature, 325: 622–625 (1987));
– Tabakmosaikvirus-Leitsequenz (TMV) (D. R. Gallie et al.; Molecular Biology of RNA, Seiten 237–256 (1989)); und
– Leitsequenz des chlorotischen Maisscheckungsvirus (MCMV) (S. A. Lommel, Virology, 81: 382–385 (1991). Siehe ebenfalls Della-Cioppa et al., Plant Physiology, 84: 965–968 (1987)).

[0053] Es wurde gezeigt, daß verschiedene Intronsequenzen die Expression steigern, wenn sie zur 5'-regulatorischen Region hinzugegeben werden, insbesondere in einkeimblättrigen Zellen. Zum Beispiel wurde festgestellt, daß die Introns aus dem Mais-Adh1-Gen signifikant die Expression des Gens vom Wildtyp unter seinem verwandten Promotor bei Einführung in Maiszellen steigern (Callis et al., Genes Develop. 1: 1183–1200 (1987)).

[0054] Zusätzlich zu Promotoren sind eine Vielzahl von 3'-Transkriptionsterminatoren ebenfalls zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung verfügbar. Transkriptionsterminatoren sind verantwortlich für die Termination der Transkription und korrekte mRNA-Polyadenylierung. Geeignete Transkriptionsterminatoren und diejenigen, von denen bekannt ist, daß sie in Pflanzen funktionieren, schließen den CaMV 35S-Terminator, den tml-Terminator, den Nopalinsynthase-Terminator, den Erbsen-rbcS E9-Terminator und andere fachbekannte ein. Diese können sowohl in einkeimblättrigen als auch in zweikeimblättrigen Pflanzen verwendet werden.

[0055] Zusätzlich zum Einfügen eines oder mehrerer der zuvor genannten Elemente in die 5'-regulatorische Region einer Zielexpressionskassette können ebenfalls andere Elemente eingeführt werden, die besonders für die Zielexpressionskassette sind. Solche Elemente schließen ein (aber sind nicht beschränkt auf) einen Minimalpromotor. Mit Minimalpromotor ist beabsichtigt, daß die Basispromotorelemente inaktiv oder beinahe inaktiv ohne Stromaufwärtsaktivierung sind. Ein solcher Promotor hat eine geringe Hintergrundaktivität in Pflanzen, wenn kein Transaktivator vorhanden ist, oder wenn Enhancer- oder Response-Element-Bindungsorte fehlen. Ein Minimalpromotor, der besonders nützlich für Zielgene in Pflanzen ist, ist der Bz1-Minimalpromotor, der aus dem bronze1-Gen von Mais erhalten wird. Der Bz1-Kernpromotor wurde aus dem "myc"-Mutante-Bz1-Luciferase-Konstrukt pBz1LucR98 über Spaltung am NheI-Ort erhalten, der sich bei –53 bis –58 befindet. Roth et al., Plant Cell 3: 317 (1991). Das abgeleitete Bz1-Kernpromotorfragment erstreckt sich somit von –53 bis +227 und schließt das Bz1-Intron-1 in der 5'-untranslatierten Region ein.

[0056] Die Expressionskassetten der vorliegenden Erfindung können in die Pflanzenzelle in einer Anzahl von fachlich anerkannten Wegen eingeführt werden. Die Fachleute werden einsehen, daß die Wahl des Verfahrens vom Typ der Pflanze, d. h. einkeimblättrig oder zweikeimblättrig, die zur Transformation gedacht ist, abhängen könnte. Geeignete Verfahren zur Transformation von Pflanzenzellen schließen ein (aber sind nicht beschränkt auf) Mikroinjektion (Crossway et al., BioTechniques 4: 320–334 (1986)), Elektroporation (Riggs et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 5602–5606 (1986)), Agrobacterium-vermittelte Transformation (Hinchee et al., Biotechnology 6: 915–921 (1988)), direkter Gentransfer (Paszkowski et al., EMBO J. 3: 2717–2722 (1984)) und ballistische Partikelbeschleunigung unter Verwendung von Vorrichtungen, die erhältlich sind von Agracetus, Inc., Madison, Wisconsin und BioRad, Hercules, Kalifornien (siehe z. B. Sanford et al., US-PS 4 945 050; und McCabe et al., Biotechnology 6: 923–926 (1988)). Siehe ebenfalls Weissinger et al., Annual Rev. Genet. 22: 421–477 (1988); Sanford et al., Particulate Science and Technology 5: 27–37 (1987) (Zwiebel); Christou et al., Plant. Physiol. 87: 671–674 (1988) (Sojabohne); McCabe et al., Bio/Technology 6: 923–926 (1988) (Sojabohne); Datta et al., Bio/Technology 8: 736–740 (1990) (Reis); Klein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 4305–4309 (1988) (Mais); Klein et al., Bio/Technology 6: 559–563 (1988) (Mais); Klein et al., Plant Physiol. 91: 440–444 (1988) (Mais); Fromm et al., Bio/Technology 8: 833–839 (1990) (Mais); und Gordon-Kamm et al., Plant Cell 2: 603–618 (1990) (Mais); Svab et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 8526–8530 (1990) (Tabakchloroplasten); Koziel et al., Biotechnology 11, 194–200 (1993) (Mais); Shimamoto et al., Nature 338: 274–277 (1989) (Reis); Christou et al., Biotechnology 9: 957–962 (1991) (Reis); europäische Patentanmeldung EP-332 581 (Knaulgras und andere Pooideae); Vasil et al., Biotechnology 11: 1553–1558 (1993) (Weizen); Weeks et al., Plant Physiol. 102: 1077–1084 (1993) (Weizen).

[0057] Ein besonders bevorzugter Satz von Ausführungsformen zur Einführung der Expressionskassetten der vorliegenden Erfindung in Mais durch Mikroprojektilbeschuß wird beschrieben in Koziel et al., Bio/Technology 11: 194–200, 1993, hier durch Verweis in seiner Gesamtheit eingeführt. Eine zusätzliche bevorzugte Ausführungsform ist das Protoplastentransformationsverfahren für Mais, wie in EP-292 435 sowie in EP-A-292 435 offenbart. Ein besonders bevorzugter Satz von Ausführungsformen zur Einführung der Expressionskassetten in Weizen durch Mikroprojektilbeschuß kann in WO 94/13822 gefunden werden.

[0058] Die Transformation von Pflanzen kann mit einem einzelnen DNA-Molekül oder mehrfachen DNA-Molekülen (d. h. Cotransformation) unternommen werden, und diese beiden Techniken sind geeignet zur Verwendung mit den Expressionskassetten der vorliegenden Erfindung. Zahlreichen Transformationsvektoren stehen für die Pflanzentransformation bereit, und die Expressionskassetten dieser Erfindung können in Verbindung mit allen solchen Vektoren verwendet werden. Die Auswahl des Vektors wird von der bevorzugten Transformationstechnik und der Zielart für die Transformation abhängen.

[0059] Viele Vektoren sind zur Transformation unter Verwendung von Agrobacterium tumefaciens verfügbar. Diese tragen typischerweise wenigstens eine T-DNA-Randsequenz und schließen Vektoren wie pBIN19 ein (Bevan, Nucl. Acids. Res. (1984)). In einer bevorzugten Ausführungsform können die in der vorliegenden Erfindung verwendeten Expressionskassetten in einen der binären Vektoren pCIB200 und pCIB2001 zur Verwendung mit Agrobacterium inseriert werden. Diese Vektorkassetten für die Agrobacterium-vermittelte Transformation wurden in der folgenden Weise konstruiert. pTJS75kan wurde durch NarI-Verdau von pTJS75 geschaffen (Schmidhauser & Helinski, J. Bacteriol. 164: 446–455 (1985)), was das Ausschneiden des Tetracyclinresistenz-Gens erlaubte, gefolgt von Insertion eines AccI-Fragments aus pUC4K, das ein NPTII trägt (Messing & Vierra, Gene 19: 259–268 (1982); Bevan et al., Nature 304: 184–187 (1983); McBride et al., Plant Molecular Biology 14: 266–276 (1990)). XhoI-Linker wurden an das EcoRV-Fragment von pCIB7 ligiert, das die linken und rechten T-DNA-Grenzen, ein pflanzenselektierbares nos/nptII-chimäres Gen und den pUC-Polylinker enthält (Rothstein et al., Gene 53: 153–161 (1987)), und das XhoI-verdaute Fragment wurde in SalI-verdautes pTJS75kan kloniert, um pCIB200 zu erzeugen (siehe ebenfalls EP-332 104, Beispiel 19). pCIB200 enthält die folgenden besonderen Polylinker-Restriktionsorte: EcoRI, SstI, KpnI, BglII, XbaI und SalI. Das Plasmid pCIB2001 ist ein Derivat von pCIB200, das durch die Insertion zusätzlicher Restriktionsorte in den Polylinker geschaffen wurde. Besondere Restriktionsorte im Polylinker von pCIB2001 sind EcoRI, SstI, KpnI, BglII, XbaI, SalI, MluI, BclI, AvrII, ApaI, Hpa und StuI. pCIB2001 besitzt zusätzlich dazu, daß es diese besonderen Restriktionsorte enthält, ebenfalls eine pflanzliche und bakterielle Kanamycinselektion, linke und rechte T-DNA-Grenzen für die Agrobacterium-vermittelte Transformation, die aus RK2 stammende trfA-Funktion zur Mobilisierung zwischen E. coli und anderen Wirten und die OriT- und OriV-Funktionen ebenfalls aus RK2. Der pCIB2001-Polylinker ist geeignet zur Klonierung von Pflanzenexpressionskassetten, die ihre eigenen regulatorischen Signale enthalten.

[0060] Ein zusätzlicher Vektor, der zu Agrobacterium-vermittelten Transformation nützlich ist, ist der binäre Vektor pCIB10, der ein Gen, das Kanamycinresistenz zur Selektion in Pflanzen codiert, rechte und linke Rand-

sequenzen von T-DNA enthält und Sequenzen aus dem Plasmid pRK252 für ein breites Wirtspektrum beinhaltet, was es ihm erlaubt, sich sowohl in E. coli als auch Agrobacterium zu vervielfältigen. Seine Konstruktion wird beschrieben von Rothstein et al., Gene 53: 153–161 (1987). Verschiedene Derivate von pCIB10 wurden konstruiert, die das Gen für Hygromycin B-Phosphotransferase beinhalten, beschrieben von Gritz et al., Gene 25: 179–188 (1983). Diese Derivate ermöglichen die Selektion von transgenen Pflanzenzellen an Hygromycin allein (pCIB743) oder an Hygromycin und Kanamycin (pCIB715, pCIB717).

[0061] Verfahren, die entweder eine Form von direktem Gentransfer oder Agrobacterium-vermitteltem Transfer verwenden, werden gewöhnlich (aber nicht notwendigerweise) mit einem selektierbaren Marker unternommen, der Resistenz gegen ein Antibiotikum (z. B. Kanamycin, Hygromycin oder Methotrexat) oder ein Herbizid (z. B. Phosphinothricin) liefern kann. Die Wahl des selektierbaren Markers zur Pflanzentransformation ist jedoch nicht kritisch für die Erfindung.

[0062] Für bestimmte Pflanzenarten können unterschiedliche Antibiotika- oder Herbizid-Selektionsmarker bevorzugt sein. Selektionsmarker, die routinemäßig in der Transformation verwendet werden, schließen das nptII-Gen ein, das Resistenz gegen Kanamycin und verwandte Antibiotika verleiht (Messing & Vierra, Gene 19: 259–268 (1982); Bevan et al., Nature 304: 184–187 (1983)), das bar-Gen, das Resistenz gegen das Herbizid Phosphinothricin verleiht (White et al., Nucl. Acids Res. 18: 1062 (1990), Spencer et al., Theor. Appl. Genet. 79: 625–631 (1990)), das hph-Gen, das Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin verleiht (Blochinger & Diggelmann, Mol. Cell Biol. 4: 2929–2931), und das dhfr-Gen, das Resistenz gegen Methotrexat verleiht (Bourouis et al., EMBO J. 2: 1099–1104 (1983)).

[0063] Ein solcher Vektor, der nützlich für direkte Gentransfertechniken in Kombination mit Selektion durch das Herbizid Basta (oder Phosphinothricin) ist, ist pCIB3064. Dieser Vektor beruht auf dem Plasmid pCIB264, das den CaMV 35S-Promotor in funktionsfähiger Fusion mit dem E. coli GUS-Gen und dem CaMV 35S-Transkriptionsterminator umfaßt und in WO 93/07278, das hier durch Verweis eingeführt wird, beschrieben wird. Ein Gen, das nützlich zur Verleihung von Resistenz gegen Phosphinothricin ist, ist das bar-Gen aus Streptomyces viridochromogenes (Thompson et al., EMBO J. 6: 2519–2523 (1987)). Dieser Vektor ist geeignet zur Klonierung von Pflanzenexpressionskassetten, die ihre eigenen regulatorischen Signale enthalten.

[0064] Ein zusätzlicher Transformationsvektor ist pSOG35, der das E. coli-Gen Dihydrofolatreduktase (DHFR) als einen selektierbaren Marker verwendet, der Resistenz gegen Methotrexat verleiht. PCR wurde verwendet, um den 35S-Promotor (~800 bp), Intron 6 aus dem Mais Adh1-Gen (~550 bp) und 18 bp der untranslatierten GUS-Leitsequenz aus pSOG10 zu amplifizieren. Ein 250 bp-Fragment, das das Dihydrofolatreduktase Typ II-Gen aus E. coli codiert, wurde ebenfalls durch PCR amplifiziert, und diese zwei PCR-Fragmente wurden mit einem SacI-PstI-Fragment aus bBI221 (Clontech) zusammengesetzt, das das pUC19 Vektor-Gerüst und den Nopalinsynthase-Terminator umfaßte. Der Zusammenbau dieser Fragmente erzeugte pSOG19, das den 35S-Promotor in Fusion mit der Intron 6-Sequenz, der GUS-Leitsequenz, dem DHFR-Gen und dem Nopalinsynthase-Terminator enthält. Austausch der GUS-Leitsequenz in pSOG19 gegen die Leitsequenz aus dem chlorotischen Maisscheckungsvirus (MCMV) erzeugte den Vektor pSOG35. pSOG19 und pSOG35 tragen das aus pUC-stammende Gen für Ampicillinresistenz und besitzen HindIII-, SphI-, PstI- und EcoRI-Orte, die zur Klonierung von fremden Sequenzen verfügbar sind.

[0065] Einer der vorteilhaften Aspekte der vorliegenden Erfindung liegt in ihrer Verwendung in der Steuerung der pflanzlichen Fruchtbarkeit unter Feldbedingungen. Eine effektive Befruchtung resultiert aus der Bildung von lebensfähigen Zygoten und kann als Prozentanteil der Samen gemessen werden, die lebensfähige Zygoten bilden. Erfindungsgemäß kann Fruchtbarkeit durch Einfügen einer Nukleotidsequenz, die ein entsprechendes Ziel codiert, in die Zielexpressionskassette gesteuert werden, worin die Expression des Zielpolypeptids mit der pflanzlichen Fruchtbarkeit wechselwirkt, was bedeutet, daß sie statistisch die pflanzliche Fruchtbarkeit reduziert oder erhöht. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung macht das Zielpolypeptid den Befruchtungsprozeß unwirksam, was bedeutet, daß die Bildung von lebensfähigen Zygoten behindert oder verhindert wird. Eine solche unwirksame Befruchtung kann als Prozentanteil der Samen gemessen werden, die keine lebensfähigen Zygoten bilden, und kann durch eine Vielzahl von Mitteln verursacht werden. Diese schließen ein (aber sind nicht beschränkt auf) 1) Unterbrechen oder Veränderung derjenigen Prozesse, die kritisch für die Bildung lebensfähiger Gameten sind, 2) Pollen oder Eizellen, die, falls sie gebildet werden, nicht funktionell sind, oder 3) Versagen des Embryosacks, des Stempels, der Narbe oder des Pollenschlauchs in der korrekten Entwicklung. In der vorliegenden Erfindung wird ein chemischer Ligand auf transgene Pflanzen unter Feldbedingungen aufgebracht, worin die Expression eines Zielpolypeptids aktiviert wird, wodurch die Befruchtung unwirksam gemacht wird. In einer anderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung erhöht die Expression des Zielpolypeptids die Fruchtbarkeit einer Pflanze oder stellt sie wieder her.

[0066] Es wird anerkannt, daß unterschiedliche Grade von wirksamer oder unwirksamer Befruchtung mit der vorliegenden Erfindung erreicht werden können. In einer bevorzugten Ausführungsform können mehr als 80% und besonders bevorzugt mehr als 95% unwirksame Befruchtung erreicht werden. Die Fähigkeit zur Bereitstellung einer Variabilität im Fruchtbarkeitsgrad erlaubt es der Erfindung, für eine Vielzahl von landwirtschaftlichen Zwecken maßgeschneidert zu werden.

[0067] Nützliche codierende Sequenzen für das Zielpolypeptid schließen ein (aber sind nicht beschränkt auf) jede Sequenz, die ein Produkt codiert, das die Befruchtung unwirksam machen kann. Diese codierenden Sequenzen können entweder homologen oder heterologen Ursprungs sein. Die Genprodukte dieser codierenden Sequenzen schließen ein (aber sind nicht beschränkt auf):

– Diphtheria Toxin A-Kette (DTA), die die Proteinsynthese hemmt, Greenfield et al., Proc. Natl. Acad. Sci.: USA, 80: 6853 (1983); Palmiter et al., Cell, 50: 435 (1987);

– Pectatlyase-pelE aus Erwinia chrysanthemi EC16, das Pectin abbaut und dadurch Celllyse verursacht; Keen et al., J. Bacteriology, 168: 595 (1986);

– T-urf13 (TURF-13) aus cms-T mitochondrialen Genomen aus Mais; dieses Gen codiert ein als URF13 bezeichnetes Polypeptid, das mitochondriale oder Plasmamembranen zerstört. Braun et al., Plant Cell, 2: 153 (1990); Dewey et al., Proc. Natl. Acad. Sci.: USA, 84: 5374 (1987); Dewey et al., Cell, 44: 439 (1986);

– Gin-Rekombinase aus dem Phagen Mu, ein Gen, das eine ortsspezifische DNA-Rekombinase codiert, die Genomumlagerungen und einen Verlust an Zellebensfähigkeit bei Expression in Zellen von Pflanzen verursachen wird. Maeser et al., Mol. Gen. Genet., 230: 170–176 (1981);

– Indolessigsäure-Lysin-Synthetase (iaaL) aus Pseudomonas syringae, die ein Enzym codiert, das Lysin an Indolessigsäure (IAA) konjugiert. Bei Expression in den Zellen von Pflanzen verursacht sie veränderte Entwicklungen aufgrund der Entfernung von IAA aus der Zelle über Konjugation. Romano et al., Genes and Development, 5: 438–446 (1991); Spena et al., Mol. Gen. Genet. 227: 205–212 (1991); Roberto et al., Proc. Natl. Acad. Sci.: USA, 87: 5795–5801;

– Ribonuklease aus Bacillus amyloliquefaciens, ebenfalls bekannt als Barnase, verdaut mRNA in denjenigen Zellen, in denen es exprimiert wird, was zum Zelltod führt. Mariani et al., Nature 347: 737–741 (1990); Mariani et al., Nature 357: 384–387 (1992); und

– CytA-Toxin-Gen aus Bacillus thuringiensis isreaeliensis, das ein Protein codiert, das moskitozid und hämolytisch ist. Bei Expression in Pflanzenzellen verursacht es den Tod der Zelle aufgrund von Zerstörung der Zellmembran. McLean et al., J. Bacteriology, 169: 1017–1023 (1987); Ellar et al., US-PS 4 918 006 (1990).

[0068] Solche Polypeptide schließen ebenfalls ein: Adeninphosphoribosyltransferase (APRT), Moffatt und Somerville, Plant Physiol., 86: 1150–1154 (1988); DNAse, RNAse, Protease, Salicylathydroxylase etc.

[0069] Es wird weiterhin erkannt, daß die Zielexpressionskassette eine 5'-regulatorische Region umfassen kann, funktionsfähig verbunden mit einer Nukleotidsequenz, die bei Transkription eine antisense-Version einer codierenden Sequenz erzeugt, die kritisch für die Bildung von lebensfähigen Gameten ist, wie APRT. Alternativ können Ribozyme verwendet werden, die auf die mRNA aus Gen gerichtet sind, das kritisch für die Gametenbildung oder -funktion ist. Solche Ribozyme werden eine hybridisierende Region von ca. neun Nukleotiden, die komplementär in der Nukleotidsequenz zu wenigstens einem Teil der Ziel-RNA ist, und eine katalytische Region umfassen, die zur Spaltung der Ziel-RNA angepaßt ist. Ribozyme werden beschrieben in EP-321 201 und WO 88/04300. Siehe ebenfalls Haseloff und Gerlach, Nature, 334: 585–591 (1988); Fedor und Uhlenbeck, Proc. Natl. Acad. Sci.: USA, 87: 1668–1672 (1990); Cech und Bass, Ann. Rev. Biochem. 55: 599–629 (1986); T. R. Cech, 236: 1532–1539 (1987); T. R. Cech, Gene, 73: 259–271 (1988); und Zang und Cech, Science, 231: 470–475 (1986).

[0070] Es wird anerkannt, daß die obigen Nukleotidsequenzen, die ein Zielpolypeptid codieren, ebenfalls funktionsfähig mit einer 5'-regulatorischen Sequenz verbunden sein können, die ihre Expression in einer gewebe- oder zellspezifischen Weise ausrichtet. Die Mittel zur Bereitstellung einer solchen gewebe- oder zellspezifischen Expression wurden oben beschrieben. Diese Spezifität der Expression stellt sicher, daß die Wirkung des Zielpolypeptids nur an denjenigen Geweben oder Zellen ausgeübt werden wird, die zur Bildung von lebensfähigen Gameten notwendig sind, und nicht nachteilig für die Pflanze über seine Wirkung auf die Fruchtbarkeit hinaus sein wird.

[0071] Es wird als im Umfang der Erfindung befindlich erkannt, daß entweder männliche Fruchtbarkeit der transgenen Pflanzen, weibliche Fruchtbarkeit der transgenen Pflanzen oder beide gesteuert werden können. Die männliche Sterilität ist das Versagen oder die Unfähigkeit zur Erzeugung von funktionellem oder lebensfähigem Pollen. Männliche Sterilität kann aus Defekten resultieren, die zur Nichtbildung von Pollen oder zum

Fehlen von funktioneller Fähigkeit im Pollen führen, wenn er gebildet wird. Deshalb wird Pollen entweder nicht gebildet oder ist, falls er gebildet wird, entweder nicht lebensfähig oder unfähig zu effektiver Befruchtung unter normalen Bedingungen.

[0072] Weibliche Sterilität ist das Versagen oder die Unfähigkeit zur Erzeugung funktioneller oder lebensfähiger Megasporen oder Embryosäcke oder anderer Gewebe, die für Pollenkeimung, Wachstum oder Befruchtung erforderlich sind. Weibliche Sterilität kann aus Defekten resultieren, die zur Nichtbildung der Megasporen oder des Embryosacks oder zum Versagen der korrekten Entwicklung von Fruchtknoten, Eizelle, Stempel, Narbe oder Pollenschlauch führen. Deshalb versagt entweder ein lebensfähiger Embryosack in der Entwicklung oder ist, falls er gebildet wird, unfähig zur effektiven Befruchtung unter normalen Bedingungen.

[0073] Zum Beispiel kann eine transgene Pflanze erhalten werden, die die EcR- und USP-Rezeptorpolypeptide in Staubbeuteln unter Verwendung eines staubbeutelspezifischen Promotors exprimiert, der an die entsprechenden Nukleotidsequenzen fusioniert ist. Zusätzlich wird die transgene Pflanze ferner eine Zielexpressionskassette mit einer 5'-regulatorischen Sequenz umfassen, die die entsprechende Response-Elementsequenz mit den Kernpromotorelementen aus Bz1 umfaßt, funktionsfähig verbunden mit der codierenden Sequenz für die Ribonuklease Barnase. Bei Anwendung von Tebufenozid als chemischer Ligand auf die transgene Pflanze erfolgt eine Heterodimerisierung der EcR- und USP-Rezeptorpolypeptide, wodurch die 5'-regulatorische Sequenz der Zielexpressionskassette aktiviert wird, mit anschließender Erzeugung des Zielpolypeptids Barnase. Die resultierende Expression von Barnase spezifisch in den Staubbeuteln verursacht Zelltod und entsprechend männliche Sterilität. Eine ähnliche Kombination aus Rezeptorpolypeptiden und Zielexpressionskassette unter Verwendung eines stempelspezifischen Promotors, der funktionsfähig mit den Nukleotidsequenzen verbunden ist, die die Rezeptorpolypeptide codieren, kann weibliche Sterilität erzeugen.

[0074] Alternativ könnte die Pflanze manipuliert werden, worin eine Expression des Zielpolypeptids die Fruchtbarkeit für eine männlich-sterile oder weiblich-sterile Pflanze wiederherstellt. Zum Beispiel könnte eine Pflanze erhalten werden, die das Barnasegen unter der Kontrolle der Ant43D-, Ant32- oder B6-Promotoren oder, wie in Mariani et al., Nature 347: 737–741 (1990) und Mariani et al., Nature 357: 384–387 (1992) beschrieben, unter der Kontrolle des TA29-Promotors exprimiert. Diese Pflanzen würden zusätzlich die Rezeptorexpressionskassetten umfassen, die die EcR- und USP-Rezeptorpolypeptide aus entweder dem gleichen staubbeutelspezifischen Promotor oder aus einem konstitutiven Promotor wie Mais-Ubiquitin, 35S oder Reis-Actin exprimieren. Diese Pflanzen würden ferner eine Zielexpressionskassette mit einer 5'-regulatorischen Sequenz umfassen, die die entsprechende Response-Elementsequenz mit den Kernpromotorelementen aus Bz1 umfaßt, funktionsfähig verbunden mit der codierenden Sequenz für den Barnaseinhibitor Barstar. Die Pflanzen würden männlich-steril sein, aber bei Anwendung von Tebufenozid als chemischer Ligand würde einer Heterodimerisierung von USP- und EcR-Rezeptorpolypeptiden erfolgen, was zur Aktivierung der 5'-regulatorischen Sequenz der Zielexpressionskassette und Erzeugung des Zielpolypeptids Barstar führt. Barstar würde die Ribonukleaseaktivität des Barnasepolypeptids hemmen, und die Staubbeutel- und Pollenentwicklung würde normal fortschreiten. Fruchtbarkeit würde wiederhergestellt werden.

[0075] Ein ähnlicher Ansatz könnte zur Steuerung der weiblichen Sterilität verwendet werden. Durch Verwendung von Promotoren, die spezifisch für die Expression in den weiblichen Fortpflanzungsgeweben sind, um die Barnaseexpression anzutreiben, anstelle der staubbeutelspezifischen Promotoren würden weiblich-sterile Pflanzen erhalten werden. Die Induzierung der Zielexpressionskassette, die die Barstar-codierende Sequenz umfaßt, durch einen chemischen Liganden würde zur Wiederherstellung der weiblichen Fruchtbarkeit führen.

[0076] Pflanzliches Vermehrungsmaterial (Frucht, Knollen, Körner, Saatgut) und speziell Saatgut wird üblicherweise mit einem Schutzüberzug behandelt, der Herbizide, Insektizide, Fungizide, Bakterizide, Nematozide, Molluskizide oder Mischungen aus verschiedenen dieser Verbindungen umfaßt. Falls gewünscht, werden diese Verbindungen zusammen mit weiteren Trägern, Tensiden oder anwendungsfördernden Hilfsstoffen formuliert, die üblicherweise auf dem Gebiet der Formulierung eingesetzt werden, um Schutz gegen Schaden bereitzustellen, der durch bakterielle, pilzliche oder tierische Schädliche verursacht wird.

[0077] Um das Saatgut zu behandeln, kann der Schutzüberzug auf die Samen entweder durch Tränken der Knollen oder Körner mit einer flüssigen Formulierung oder durch Überziehen mit einer kombinierten Naß- oder Trockenformulierung aufgebracht werden. In speziellen Fällen sind andere Auftragungsverfahren auf die Pflanzen möglich, wie eine auf die Knospen oder die Frucht gerichtete Behandlung.

[0078] Ein erfindungsgemäßer Pflanzensamen kann mit einem Saatgutschutzüberzug behandelt werden, der eine Saatgutbehandlungverbindung umfaßt, wie Captan, Carboxin, Thiram (TMTD®), Methalaxyl (Apron®), Pi-

rimiphos-methyl (Actellic®) und andere, die üblicherweise in der Saatgutbehandlung verwendet werden. Es ist daher eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Pflanzenvermehrungsmaterial und speziell Saatgut bereitzustellen, das mit einem Saatgutschutzüberzug behandelt ist, der üblicherweise in der Saatgutbehandlung verwendet wird.

[0079] Die obigen Ansätze könnten jedes Gen für weibliche oder männliche Sterilität verwenden, für das ein Restorer-Gen entwickelt werden könnte. Andere potentielle Restorer-Gen werden in EP 412 911 beschrieben.

[0080] Deshalb kann die vorliegende Erfindung in jeder Pflanze verwendet werden, die transformiert und regeneriert werden kann, um transgene Pflanzen zu erhalten, in denen die männliche und/oder weibliche Sterilität durch die Anwendung des entsprechenden chemischen Liganden gesteuert werden kann. Die Steuerung der pflanzlichen Fruchtbarkeit ist besonders nützlich zur Herstellung von Hybridsaatgut. Zur Erzeugung von Hybridsaatgut, das nicht mit geselbstetem Saatgut verunreinigt ist, müssen Bestäubungskontrollverfahren implementiert werden, um Kreuzbestäubung und keine Selbstbestäubung sicherzustellen. Dies wird gewöhnlich durch mechanische, genetische oder chemische Hybridisierungsmittel (CHAs) erreicht. Zum Beispiel ist bei Mais die derzeitige Praxis die Entquastung des weiblichen (oder Samen-)Elters, was ein zeit- und arbeitsaufwendiger Prozeß ist. Bei Weizen ist die Kontrolle der Fruchtbarkeit durch mechanische Mittel unpraktisch im Maßstab der Saatgutherstellung, und genetische Quellen für die Kontrolle sind nicht entwickelt. Die Verwendung der vorliegenden Erfindung in der Herstellung von Hybridsaatgut bietet die Vorteile von Verläßlichkeit, einfacher Anwendung und Kontrolle von entweder männlicher oder weiblicher Fruchtbarkeit.

[0081] Die transgenen Pflanzen, die die entsprechenden Rezeptorexpressionskassetten und Zielexpressionskassette enthalten, können homozygot gemacht und unbegrenzt aufrechterhalten werden. Zum Erhalt von Hybridsaatgut werden homozygote Linien von Elter 1 und Elter 2 gekreuzt. In einem Beispiel der Verwendung der vorliegenden Erfindung zur Herstellung von Hybridsaatgut wird Elter 1 manipuliert, um in Gegenwart des entsprechenden chemischen Liganden männlich-steril zu sein, wohingegen Elter 2 manipuliert wird, um in Gegenwart eines entsprechenden chemischen Liganden weiblich-steril zu sein. Nach Anwendung eines entsprechenden chemischen Liganden, der durch die Wahl der in den Rezeptorpolypeptiden vorhandenen Ligandenbindungsdomäne bestimmt wird, wird die einzige erfolgreiche Saatguterzeugung ein Ergebnis von Pollen von Elter 2 sein, der Eizellen von Elter 1 befruchtet. In einem zweiten Beispiel der Verwendung der vorliegenden Erfindung wird Elter 1 manipuliert, um in Abwesenheit des entsprechenden chemischen Liganden männlich-steril zu sein, und Elter 2 wird manipuliert, um in Abwesenheit des chemischen Liganden weiblich-steril zu sein. Die entsprechende Chemikalie wird angewendet, um jede Linie durch Selbstbefruchtung aufrechtzuerhalten. Zur Herstellung von Hybridsaatgut werden die zwei Elternlinien zwischengepflanzt, und nur Hybridsaatgut wird erhalten. Die Fruchtbarkeit wird für die Nachkommenschaft-Hybridpflanzen durch ein eingeführtes Restorer-Gen wiederhergestellt. Durch diese Mittel kann jedes gewünschte Hybridsaatgut hergestellt werden.

[0082] Die folgenden Beispiele beschreiben weiter die Materialien und Methoden, die zur Durchführung der Erfindung verwendet werden, und die anschließenden Ergebnisse. Sie werden zur Erläuterung angeboten, und ihre Darstellung sollte nicht als Beschränkung der beanspruchten Erfindung betrachtet werden.

BEISPIEL 1: Konstruktion einer pflanzenexprimierbaren Rezeptorexpressionskassette, die den Ecdyson-Rezeptor codiert

[0083] Die DNA-codierende Region für den Ecdyson-Rezeptor (EcR) von Drosophila wurde aus einer cDNA-Bibliothek, die aus Canton S pupae (Tag 6) stammte, hergestellt in λgt11 (Clontech, Katalog Nr. IL 1005b), und aus Fragmenten isoliert, die durch genomische PCR mir Oligonukleotiden erzeugt wurden, die aus der veröffentlichten Sequenz der B1-Isoform des EcR geschaffen wurden (Koelle et al., Cell 67: 59, 1991). Die B1-Isoform-EcR-Sequenz wurde durch automatisierte Sequenzanalyse unter Verwendung von Standardverfahren und Angleichung mit der veröffentlichten Sequenz bestätigt (Talbot et al., Cell 73: 1323, 1993). Die exprimierte EcR-codierende Region voller Länge wurde modifiziert, so daß sie einen BamHI-Ort unmittelbar stromaufwärts vom Startcodon enthielt, unter Verwendung des Oligonukleotids SF43 (5'-CGC GGA TCC TAA ACA ATG AAG CGG CGC TGG TCG AAC AAC GGC-3'; SEQ ID NO: 1) in einer PCR-Reaktion. Die Pflanzenexpressionsvektoren pMF6 und pMF7 enthalten einen Blumenkohlmosaikvirus-35S-Promotor (CaMV 35S), ein Mais-Adhl-Intron1 und ein Nopalinsynthetase-Polyadenylierungs- und -terminationssignal (siehe Goff et al., Genes and Development 5: 298, 1991). Die Vektoren pMF6 und pMF7 unterscheiden sich nur in der Orientierung des Polylinkers, der zur Insertion der gewünschten codierenden Sequenz verwendet wird. Die EcR-codierende Sequenz voller Länge wurde in den pflanzlichen CamV 35S-Expressionsvektor pMF6 unter Verwendung der flankierenden BamHI-Restriktionsorte ligiert. Diese Rezeptorexpressionskassette wird als 35S/EcR bezeichnet.

BEISPIEL 2: Konstruktion einer pflanzenexprimierbaren Rezeptorexpressionskassette, die den Ultraspiracle-Rezeptor codiert

[0084] Die cDNA, die den nativen Ultraspiracle-Rezeptor (USP) von Drosophila codiert, wird von Henrich et al. beschrieben, Nucleic Acids Research 18: 4143 (1990). Die USP-codierende Sequenz voller Länge mit den flankierenden 5'- und 3'-untranslatierten Regionen wurden in den Pflanzenexpressionsvektor pMF7 (beschrieben in Beispiel 1) unter Verwendung der flankierenden EcoRI-Restriktionsorte ligiert. Die Rezeptorexpressionskassette wird als 35S/USP bezeichnet.

BEISPIEL 3: Konstruktion einer Rezeptorexpressionskassette mit der DNA-Bindungsdomäne aus GAL4 und der Ligandenbindungsdomäne aus EcR

[0085] Eine Rezeptorexpressionskassette wurde konstruiert, worin die DNA-Bindungsdomäne von EcR durch die DNA-Bindungsdomäne von GAL4 ersetzt ist, fusioniert an der N-terminalen Position. Die DNA-codierende Region für den EcR aus Drosophila wurde wie in Beispiel 1 beschrieben erhalten. Die codierende Sequenz für die DNA-Bindungsdomäne von GAL4 wurde aus Plasmid pMA210 subkloniert. Ma und Ptashne, Cell, 48: 847 (1987).

[0086] Eine Rezeptorexpressionskassette, die ein chimäres GAL4-EcR-Rezeptorpolypeptid codiert, wurde durch Fusion der DNA-Bindungsdomäne von GAL4 mit der Ligandenbindungsdomäne und dem Carboxy-Terminus von EcR konstruiert. Zur Herstellung der Fusion wurde das Oligonukleotid SF23 (5'-CGC GGG ATC CAT GCG GCC GGA ATG CGT CGT CCC G-3'; SEQ ID NO: 2) verwendet, um durch PCR einen BamHI-Ort in die cDNA-Sequenz für EcR an der Nukleotidposition einzuführen, die dem Aminosäurerest 330 entspricht (unmittelbar im Anschluß an die EcR-DNA-Bindungsdomäne). Die resultierende trunkierte EcR-codierende Sequenz ($EcR^{330-878}$) wurde in das Plasmid pKS^+ (Stratagene) subkloniert.

[0087] Ein Subklon von GAL4 wurde aus Plasmid pMA210 erhalten, das die codierende Sequenz der DNA-Bindungsdomäne enthielt (Aminosäuren 1–147), indem der Aminoterminus von GAL4 bis zum ClaI-Ort in pSK+ (Stratagene) wie zuvor beschrieben subkloniert wurde (Goff et al., Genes and Development 5: 298, 1991). Dieses Plasmid wurde als pSKGAL2 bezeichnet und mit ClaI und KpnI geschnitten, und das folgende doppelsträngige Oligonukleotid wurde inseriert:

```
5'- CGGGGGATCCTAAGTAAGTAAGGTAC-3' (SEQ ID NO:10)
      ||||||||||||||||||||
  3'- CCCCTAGGATTCATTCATTC - 5'   (SEQ ID NO:11)
```

[0088] Das resultierende Plasmid wurde als pSKGAL2.3 bezeichnet. Die vollständige Fusion 35S/GAL4-$EcR^{330-878}$ wurde unter Verwendung der BamHI-Orte in den Polylinkern erzeugt, die die DNA-Bindungsdomäne von GAL4 in pSK+ und die $EcR^{330-878}$-Einheit in pKS+ flankieren. Diese codierenden Sequenzen wurden in den einkeimblättrigen Expressionsvektor pMF6 (beschrieben in Beispiel 1) über die Verwendung der flankierenden EcoRI-Restriktionsorte ligiert. Diese Rezeptorexpressionskassette wird als 35S/GAL4-$EcR^{330-878}$ bezeichnet.

BEISPIEL 4: Konstruktion einer pflanzenexprimierbaren Rezeptorexpressionskassette mit der Ligandenbindungsdomäne aus Ultraspiracle und der Transaktivierungsdomäne aus VP16

[0089] Eine Rezeptorexpressionskassette wurde konstruiert, die die Ligandenbindungsdomäne von USP mit der Transaktivierungsdomäne von VP16 umfaßt, fusioniert an entweder den N-Terminus oder C-Terminus des USP-Polypeptids.

[0090] Zur Konstruktion der Rezeptorexpressionskassette, die ein chimäres Polypeptid mit der Transaktivierungsdomäne von VP16 an der C-terminalen Position codiert, wurden der Carboxy-Terminus und das Stoppcodon der cDNA für den Rezeptor USP (beschrieben in Beispiel 2) durch Subklonieren in pKS+ (Stratagene) entfernt, wobei der XhoI-Ort an USP-Nukleotid Nr. 1471 der codierenden Sequenz verwendet wurde. Der resultierende USP-Subklon, der die Aminosäuren 1 bis 490 codiert, wurde an die Transaktivierungsdomäne von VP16 unter Verwendung des flankierenden KpnI-Restriktionsortes des USP-Subklons und des KpnI-Ortes von pSJT1193CRF3 fusioniert, das die Carboxyterminalen 80 Aminosäuren von VP16 codiert (Triezenberg et al., Genes and Develop. 2: 718–729 (1988)). Die resultierende USP-VP16-Fusion wurde in den CaMV 35S-Pflanzenexpressionsvektor pMF7 (beschrieben in Beispiel 1) unter Verwendung der EcoRI- und BamHI-Restriktionsenzymorte kloniert, die die codierende Sequenz von USP-VP16 flankieren. Diese Rezeptorexpressionskassette wird als 35S/USP-VP16 bezeichnet.

[0091] Das USP-Derivat mit der an den Aminoterminus fusionierten Transkriptionsaktivierungsdomäne wurde konstruiert, indem zuerst ein BamHI-Ort benachbart zum USP-Startcodon unter Verwendung des Oligonukleotids SF42 (5'-CGC GGA TCC ATG GAC AAC TGC GAC CAG GAC-3'; SEQ ID NO: 3) in einer PCR-Reaktion konstruiert wurde. Das Stoppcodon in VP16 wurde eliminiert und ein flankierender BamHI-Ort unter Verwendung des Oligonukleotids SF37 (5'-GCG GGA TCC CCC ACC GTA CTC GTC AAT TC-3'; SEQ ID NO: 4) eingeführt, und ein Startcodon mit einer pflanzlichen Konsensus-Sequenz unmittelbar stromaufwärts des Startcodons sowie ein BamHI-Ort wurden am Amino-terminalen Ende unter Verwendung des Oligonukleotids SA115 (5'-GTC GAG CTC TCG GAT CCT AAA ACA ATG GCC CCC CCG ACC GAT GTC-3'; SEQ ID NO: 5) als Primer in einer PCR-Reaktion eingeführt. Die resultierende VP16-Aktivierungsdomäne und USP-codierende Sequenz (die die Aminosäuren 1 bis 507 codiert) wurden im Raster durch die benachbarten BamHI-Orte verbunden, und die VP16-USP-codierende Sequenz wurde in den CaMV 35S-Pflanzenexpressionsvektor pMF7 durch die 5'-BamHI- und 3'-EcoRI-Orte inseriert. Diese Rezeptorexpressionskassette wird als 35S/VP16-USP bezeichnet.

BEISPIEL 5: Konstruktion einer Rezeptorexpressionskassette mit der DNA-Bindungsdomäne und Liganden-bindungsdomäne aus EcR und der Transaktivierungsdomäne aus dem C1-regulatorischen Gen von Mais

[0092] Die $EcR^{227-825}$-C1-Fusion wurde erzeugt durch Plazieren eines Startcodons unmittelbar vor die EcR-DNA-Bindungsdomäne, wobei das Oligonukleotid SF30 (5'-CGC-GGA-TCC-ATG-GGT-CGC-GAT-GAT-CTC-TCG-CCT-TC-3'; SEQ ID NO: 8) in einer PCR-Reaktion an der EcR-codierenden Sequenz voller Länge verwendet wurde. Die codierende Sequenz für die Transkriptionsaktivierungsdomäne (Aminosäuren 219–273) des Mais C1-Proteins (Goff et al., Genes and Develop. 5: 298–309 (1991)) wurde im Raster an die codierende Sequenz für die Aminosäuren 51 bis 825 von EcR fusioniert (am EcR KpnI-Restriktionsenzymort). Die C1-Transaktivierungsdomäne wurde mit EcR durch einen Polylinker verbunden, der VPGPPSRSRVSISLHA (SEQ ID NO: 9) codiert. Der 35S/$EcR^{227-825}$-C1-Pflanzenexpressionsvektor-Fusion wurde durch Insertion eines BamHI-Fragments, das die codierende Sequenz trägt, in den pMF7-Vektor konstruiert. Diese Rezeptorexpressionskassette wird als 35S/$EcR^{227-825}$-C1 bezeichnet.

BEISPIEL 6: Konstruktion einer Rezeptorexpressionskassette mit der DNA-Bindungsdomäne aus GAL4, der Ligandenbindungsdomäne aus EcR und der Transaktivierungsdomäne aus dem C1-regulatorischen Gen von Mais

[0093] Eine GAL-4-$EcR^{330-825}$-C1-Fusion wurde unter Verwendung des in Beispiel 3 beschriebenen GAL4-$EcR^{330-878}$-Konstrukts und des $EcR^{227-825}$-C1-Konstrukts aus Beispiel 5 konstruiert. Die Sequenz der EcR-codierenden Region (beginnend bei Aminosäure 456) wurde am AatII-Ort ausgetauscht. Diese Rezeptorexpressionskassette wird als 35S/GAL4-$EcR^{330-825}$-C1 bezeichnet.

BEISPIEL 7: Konstruktion einer pflanzenexprimierbaren Rezeptorexpressionskassette, die den Retinoic-X-Rezeptor (RXR) codiert

[0094] Die Maus-Retinolsäurerezeptor-α-Isoform wurde durch PCR-Amplifikation des ersten Stranges von Mäuseleber-cDNA unter Verwendung von Primern kloniert, die gegen die von Chambon et al. beschriebene Sequenz gerichtet sind (Genbank-Eingangsnr. M84817; Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently, Cell 68, 377–395 (1992)). Das RXRα-PCR-Fragment wurde unter Verwendung der Oligonukleotide dT_{30} und SF165 (5'-CGC GGA TCC ATG GAC ACC AAA CAT TTC CT-3', SEQ ID NO: 12) oder SF167 (5'-CGC GGA ATT CTA AAC AAT GGA CAC CAA ACA TTT CCT-3'; SEQ ID NO: 13) erzeugt. Die resultierenden PCR-Produkte wurden mit NsiI (das in der 3'-untranslatierten Region der amplifizierten RXR-cDNA schneidet) und einem Ort im 5'-Oligonukleotidprimer (BamHI für SF165 oder EcoRI für SF167) verdaut und in pUC21 subkloniert. Der SF167-Primer enthält ein pflanzliches Konsensus-Startcodon für RXRα. Eine exprimierte RXRα-codierende Sequenz wurde erzeugt, indem die klonierte RXRα-codierende Region mit dem pflanzlichen Konsensus-Startcodon in einen CaMV 35S-Expressionsvektor (pMF7) über flankierende 5'-EcoRI- und 3'-BglII-Restriktionsenzymorte subkloniert wurde. Diese Rezeptorexpressionskassette wird als 35S/RXR bezeichnet.

BEISPIEL 8: Konstruktion einer pflanzenexprimierbaren Rezeptorkassette, die den RXR-Rezeptor und die Transaktivierungsdomäne von VP16 codiert

[0095] Ein RXRα-Derivat mit der an den Aminoterminus fusionierten Transkriptionsaktivierungsdomäne von VP16 wurde unter Verwendung des zur in Beispiel 7 beschriebenen RXRα-codierenden Region benachbarten BamHI-Ortes konstruiert. Das Stoppcodon in VP16 wurde eliminiert und ein flankierender BamHI-Ort wie in

Beispiel 4 oben beschrieben eingeführt. Die resultierende VP16-Aktivierungsdomäne und RXRα-codierende Sequenz (die die Aminosäuren 1 bis 468 codiert) wurde im Raster durch die benachbarten BamHI-Orte verbunden, und die VP16-RXRα-codierende Sequenz wurde in den CaMV 35S-Pflanzenexpressionsvektor pMF7 durch die flankierenden 5'-EcoRI- und 3'-BglII-Orte inseriert. Diese Rezeptorexpressionskassette wird als 35S/VP16-RXR bezeichnet.

BEISPIEL 9: Konstruktion einer pflanzenexprimierbaren Rezeptorkassette, die den RXR-Rezeptor und die Transaktivierungsdomäne aus dem C1-regulatorischen Gen von Mais codiert

[0096] Ein RXRα-Derivat mit der an den Carboxy-Terminus fusionierten Mais-C1-Transkriptionsaktivierungsdomäne wurde konstruiert, indem zuerst das Stoppcodon für RXRα eliminiert und ein BglI2-Restriktionsort zur Fusion an C1 im Raster unter Verwendung des Oligonukleotids SF170 (5'-CGC AGA TCT GGG TGG CTT GAT GTG GTG CCT C-3'; SEQ ID NO: 14) in einer PCR-Amplifikationsreaktion zusammen mit dem intern bindenden Oligonukleotid SF168 (5'-CTC TTC ACT CTT GTG GAG TG-3'; SEQ ID NO: 15) inseriert wurde. Das resultierende PCR-Fragment wurde an internen BamHI und flankierenden BglII-Restriktionsenzymorten verdaut und in mit BamHI und BglII verdautes pUC21 kloniert. Dieser Subklon wurde mit den flankierenden NotI- und BamHI-Orten verdaut, und die Amino-terminalen codierenden Sequenzen von RXRα wurden inseriert, um die intakte codierende Sequenz von RXRα mit einem pflanzlichen Konsensus-Startcodon zu regenerieren (wie in Beispiel 7 oben beschrieben), und das Stoppcodon wurde entfernt. Die Aktivierungsdomäne aus dem Mais-C1-Transkriptionsaktivator wurde durch PCR unter Verwendung des Oligonukleotidprimers SF140 (5'-CGC AGA TCT TGG ACG AGC CGT GCT TCT CCG GC-3'; SEQ ID NO: 18) und des universellen Vorwärts-Sequenzierungsprimers (NEB#1211; 5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3', SEQ ID NO: 17) an einem Subklon hergestellt, der die C1-cDNA enthält (Goff et al., Identification of funktional domains in the maize transcriptional activator C1: comparsion of wild-type and dominant inhibitor proteins, Genes & Development 5: 298–309 (1991)). Die resultierende C1-Transkriptionsaktivierungsdomäne (Aminosäuren 234–273) und die flankierende 3'-untranslatierte Region wurden im Raster an die RXRα-codierende Sequenz über den BglII-Ort fusioniert, im Anschluß an die RXRα-codierende Sequenz und den BglII-Ort, der der C1-Transkriptionsaktivierungsdomäne vorangeht. Diese fusionierte RXRα-C1-Hybrid-codierende Sequenz wurde in den CaMV 35S-Pflanzenexpressionsvektor pMF7 unter Verwendung der flankierenden 5'- und 3'-EcoRI-Orte inseriert. Diese Rezeptorexpressionskassette wird als 35S/RXR-C1 bezeichnet.

BEISPIEL 10: Konstruktion einer pflanzenexprimierbaren Zielexpressionskassette, die Leuchtkäfer-Luciferase mit dem Response-Element für die GAL4-DNA-Bindungsdomäne codiert

[0097] Die pflanzenexprimierbare Zielexpressionskassette, die Leuchtkäfer-Luciferase mit dem Response-Element für die DNA-Bindungsdomäne von GAL4 codiert, wurde in der folgenden Weise konstruiert. Der Mais-Bronze-1-(Bz1)-Kernpromotor, der die Synthese von Leuchtkäfer-Luciferase antreibt, wurde aus dem BZ1-Reporter pBz1LucR98 (Roth et al., Plant Cell 3: 317, 1991) über die NheI- und SphI-Orte entfernt und in ein aus pUC6S stammendes Plasmid, das das Luciferase-Gen trägt, plaziert. Der modifizierte Bz1-Kernpromotor enthält einen NheI-Ort (GCTAGC) und Bz1-Promotorsequenzen bis zur Nukleotidposition –53 (Roth et al., Plant Cell 3: 317, 1991). Zehn GAL4-Bindungsorte wurden aus dem GAL4-regulierten Reporter pGALLuc2 (Goff et al., Genes and Development 5: 298, 1991) durch Verdauung mit EcoRI und PstI entfernt und in pBlueScript (Stratagene) unter Verwendung der gleichen Restriktionsenzymorte entfernt. Der HindIII-Ort am 5'-Ende der GAL4-Bindungsorte wurde zu einem BamHI-ort durch Insertion eines HindIII/BamHI/HindIII-Adapters verändert, und das resultierende BamHI-Fragment, das die GAL4-Bindungsorte enthält, wurde entfernt und in einen BglII-Ort stromaufwärts des Bz1-Kernpromotors, der Luciferase antreibt, plaziert. Diese Zielexpressionskassette wird als $(GAL4_{b.s.})_{10}$-Bzl_{TATA}/Luc bezeichnet.

BEISPIEL 11: Konstruktion einer pflanzenexprimierbaren Zielexpressionskassette, die Leuchtkäfer-Luciferase mit dem Response-Element für die EcR-DNA-Bindungsdomäne codiert

[0098] Die pflanzenexprimierbare Zielexpressionskassette, die Leuchtkäfer-Luciferase mit dem Response-Element für die DNA-Bindungsdomäne von EcR (EcRE) codiert, wurde in der folgenden Weise konstruiert. Das Mais-Bz1-Kernpromotor-Luciferase-Konstrukt in dem aus pUC6S stammenden Plasmid, wie in Beispiel 7 beschrieben, wurde als Ausgangspunkt verwendet. Doppelsträngige synthetische Oligonukleotide, die das Drosophila hsp27-Response-Element enthalten, das die DNA-Bindungsdomäne von EcR ergänzt, wurden mit BamHI- und BglII-kohäsiven Enden konstruiert (SF25: 5'-GAT CCG ACA AGG GTT CAA TGC ACT TGT CA-3'; SEQ ID NO: 6, SF26: 5'-GAT CTG ACA AGT GCA TTG AAC CCT TGT CG-3'; SEQ ID NO: 7), phosphoryliert und stromaufwärts des Bz1-Kernpromotors durch Insertion in einen besonderen BglII-Ort ligiert. Multiple Kopien des Response-Elements wurden durch sequenziellen BglII-Verdau und Insertion zusätzlicher

doppelsträngiger Oligonukleotide erhalten. Diese Zielexpressionskassette wird entweder als $(EcRE)_5$-Bz1/Luc, $(EcRE)_6$-Bz1/Luc oder $(EcRE)_8$-Bz1/Luc bezeichnet, abhängig von der Anzahl von palindromischen Gesamtstellen-Response-Elementen, die innerhalb der Promotorregion enthalten sind (5, 6 bzw. 8).

BEISPIEL 12: Transformation von Pflanzenzellen und Steuerung der Zielpolypeptidexpression durch Rezeptorpolypeptide in Gegenwart eines chemischen Liganden

[0099] Die Steuerung der Zielpolypeptidexpression durch verschiedene Rezeptorpolypeptide, einschließlich der chimären Rezeptorpolypeptide der vorliegenden Erfindung, kann durch simultane Transformation von Pflanzenzellen mit den notwendigen Genkonstruktionen unter Verwendung von Hochgeschwindigkeitsmikroprojektilbeschuß gefolgt von biochemischem Assay auf Gegenwart des Zielpolypeptids gezeigt werden. Die notwendigen Genkonstruktionen umfassen eine erste Rezeptorexpressionskassette, die ein erstes Rezeptorpolypeptid codiert, und eine zweite Rezeptorexpressionskassette, die ein zweite Rezeptorpolypeptid codiert. Zusätzlich ist ebenfalls eine Zielexpressionskassette erforderlich, die ein Zielpolypeptid codiert (**Fig. 1**).

[0100] Die Expressionskassetten wurden simultan auf Maissuspensionszellen, die in flüssigem N6-Medium kultiviert wurden (Chu et al., Scientia Sinica XVIII: 659–668, 1975), durch Hochgeschwindigkeitsmikroprojektilbeschuß unter Verwendung von Standardtechniken der DNA-Präzipitation auf Mikroprojektile und durch mit komprimiertem Helium angetriebenen Hochgeschwindigkeitsbeschuß übertragen (PDS-1000/He, BioRad, Hercules, CA). Transfizierte Zellen wurden in flüssiger Suspension in Gegenwart des entsprechenden chemischen Liganden für ca. 48 Stunden in N6-Medium inkubiert. Nach der Inkubation wurden die transformierten Zellen geerntet und dann bei 0°C homogenisiert. Trümmer in den Extrakten wurden durch Zentrifugieren mit 10 000 g bei 4°C 5 min entfernt.

[0101] Zielpolypeptidexpression wurde durch Testen des Extrakts auf Gegenwart des durch die Zielexpressionskassette codierten Produkt detektiert. Eine üblicherweise verwendete codierende Sequenz für das Zielpolypeptid bei Untersuchung der Steuerung der Expression durch die Rezeptorpolypeptide in Gegenwart eines chemischen Liganden ist Leuchtkäfer-Luciferase. Die Aktivität von Leuchtkäfer-Luciferase wird durch Quantifizieren der Chemilumineszenz bestimmt, die durch die Luciferase-katalysierte Phosphorylierung von Luciferin unter Verwendung von ATP als Substrat erzeugt wird (Promega Luciferase Kit, Katalog Nr. E1500), wobei ein Luminometer "Analytical Luminescence" Modell 2001 verwendet wird.

BEISPIEL 13: Die Rezeptorpolypeptide EcR und USP aktivieren die Expression eines Zielpolypeptids in Pflanzenzellen

[0102] Unter Verwendung des Transformationsverfahrens aus Beispiel 12 wurden die Rezeptorexpressionskassette 35S/EcR (Beispiel 1), die Rezeptorexpressionskassette 35S/USP (Beispiel 2) und die Zielexpressionskassette $(EcRE)_5$-Bz1/Luc (Beispiel 11) in Maiszellen kotransformiert (siehe **Fig. 2**). Transformierte Zellen wurden in Gegenwart von 10 µM Tebufenozid oder 2 µM Muristeron als chemische Liganden für ca. 48 Stunden inkubiert. Luciferase-Assays wurden wie in Beispiel 12 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1

Rezeptor	Gegenwart von chemischem Ligand	Luciferase-Aktivität (Lichteinheiten)
ohne	ohne	427
35S/EcR	ohne	295
35S/EcR + 35S/USP	Tefufenzozid	860
35S/EcR + 35S/USP	Muristeron	1351

[0103] Die obigen Ergebnisse zeigen, daß die 5'-regulatorische Region der Zielexpressionskassette, die die EcR-Response-Elemente umfaßt, in Pflanzenzellen durch die Rezeptorpolypeptide EcR und USP in Gegenwart eines komplementären chemischen Liganden aktiviert werden kann. Die Expressionsstärke des Zielpolypeptids Luciferase war ca. 2- bis 3-fach oberhalb der in Abwesenheit von chemischem Liganden beobachteten.

BEISPIEL 14: Die Rezeptorpolypeptide VP16-USP und EcR aktivieren die Expression eines Zielpolypeptids in Pflanzenzellen

[0104] Unter Verwendung des Transformationsverfahrens aus Beispiel 12 wurden die Rezeptorexpressionskassette 35S/EcR (Beispiel 1), die Rezeptorexpressionskassette 35S/VP16-USP (Beispiel 4) und die Zielexpressionskassette $(EcRE)_6$-Bz1/Luc (Beispiel 11) in Maiszellen kotransformiert. Transformierte Zellen wurden in Gegenwart von 1 µM Ecdyson, 10 µM Tebufenozid oder 2 µM Muristeron als chemische Liganden für 48 Stunden inkubiert. Luciferase-Assays wurden wie in Beispiel 12 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2

Rezeptor	Gegenwart von chemischem Ligand	Luciferase-Aktivität (Lichteinheiten)
ohne	ohne	427
35S/EcR + 35S/VP16-USP	ohne	4486
35S/EcR + 35S/VP16-USP	Ecdyson	7420
35S/EcR + 35S/VP16-USP	Tebufenozid	7003
35S/EcR + 35S/VP16-USP	Muristeron	12374

[0105] Die obigen Ergebnisse zeigen, daß die 5'-regulatorische Region der Zielexpressionskassette, die die EcR-Response-Elemente umfaßt, in Pflanzenzellen durch das Rezeptorpolypeptid EcR und das chimäre Rezeptorpolypeptid VP16-UDP in Gegenwart eines komplementären chemischen Liganden aktiviert werden kann. Die Expressionsstärke des Zielpolypeptids Luciferase war ca. 2- bis 3-fach oberhalb der in Abwesenheit von chemischem Liganden beobachteten.

BEISPIEL 15: Die Rezeptorpolypeptide $EcR^{227-858}$-C1 und USP aktivieren die Expression eines Zielpolypeptids in Pflanzenzellen

[0106] Unter Verwendung des Transformationsverfahrens aus Beispiel 12 wurden die Rezeptorexpressionskassette 35S/USP (Beispiel 2), die Rezeptorexpressionskassette 35S/EcR227-825-C1 (Beispiel 5) und die Zielexpressionskassette $(EcRE)_6$-Bz1/Luc (Beispiel 8) in Maiszellen kotransformiert. Transformierte Zellen wurden in Gegenwart von 10 µM Tebufenozid als chemischer Ligand für 48 Stunden inkubiert. Luciferase-Assays wurden wie in Beispiel 12 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3:

Rezeptor	Gegenwart von chemischem Ligand	Luciferase-Aktivität (Lichteinheiten)
ohne	ohne	5626
35S/USP + 35S/$EcR^{227-825}$-C1	ohne	10024
35S/USP + 35S/$EcR^{227-825}$-C1	Tebufenozid	24631

[0107] Die obigen Ergebnisse zeigen, daß die 5'-regulatorische Region der Zielexpressionskassette, die die EcR-Response-Element umfaßt, in Pflanzenzellen durch das Rezeptorpolypeptid USP und das chimäre Rezeptorpolypeptid $EcR^{227-825}$-C1 in Gegenwart eines komplentären chemischen Liganden aktiviert werden kann. Das chimäre Rezeptorpolypeptid verwendet die Transaktivierungsdomäne des regulatorischen Gens C1 aus Mais, fusioniert an den C-Terminus eines trunkierten EcR, wobei die Trunkierung die Transaktivierungsdomäne von EcR entfernt hat. Die Expressionsstärke des Zielpolypeptids Luciferase war mehr als 2-fach oberhalb der in Abwesenheit von chemischem Liganden beobachteten.

BEISPIEL 16: Aktivierung einer Zielexpressionskassette in Pflanzenzellen wird durch Verwendung eines chimären Rezeptorpolypeptids mit starker Transaktivierungsdomäne gesteigert

[0108] Unter Verwendung des Transformationsverfahrens aus Beispiel 12 wurden die Rezeptorexpressionskassette 35S/GAL4-EcR$^{330-878}$ (Beispiel 3), die Rezeptorexpressionskassette 35S/USP-VP16 (Beispiel 4) und die Zielexpressionskassette $(GAL4)_{10}$-Bz1/Luc (Beispiel 10) in Maiszellen kotransformiert (Fig. 3). Transformierte Zellen wurden in Gegenwart von 10 µm Tebufenozid als chemischer Ligand für ca. 48 Stunden inkubiert. Luciferase-Assays wurden wie in Beispiel 12 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4

Rezeptor	Gegenwart von chemischem Ligand	Luciferase-Aktivität (Lichteinheiten)
35S/GAL4-EcR$^{330-878}$	-	2804
35S/USP-VP16	-	6121
35S(GAL4-EcR$^{330-878}$ + 35S/USP-VP16	-	3586
35S/GAL4-EcR$^{330-878}$ + 35S/USP-VP16	+	130601

[0109] Die obigen Ergebnisse zeigen, daß die 5'-regulatorische Region der Zielexpressionskassette, die die GAL4-Response-Elemente umfaßt, in Pflanzenzellen durch die Rezeptorpolypeptide GAL4-EcR$^{330-878}$ und USP-VP16 in Gegenwart eines komplementären chemischen Liganden aktiviert werden kann. Die Expressionsstärke des Zielpolypeptids Luciferase war 36-fach oberhalb der in Abwesenheit von chemischem Liganden beobachteten. Dies zeigt, daß 1) das chimäre Rezeptorpolypeptid an die GAL4-Response-Elemente der Zielexpressionskassette band, 2) Tebufenozid an die Ligandenbindungsdomäne der EcR$^{330-878}$-Einheit im chimären Rezeptorpolypeptid band, 3) die zwei chimären Rezeptorpolypeptide korrekt heterodimerisierten und 4) die Heterodimerisierung die Transaktivierungsdomäne von VP16 in Position zur Aktivierung brachte.

BEISPIEL 17: Aktivierung einer Zielexpressionskassette in Pflanzenzellen unter Verwendung eines chimären EcR-Rezeptorpolypeptids und eines RXR-Derivats mit starker Transaktivierungsdomäne

[0110] Unter Verwendung des Transformationsverfahrens aus Beispiel 12 wurden die Rezeptorexpressionskassette 35S/GAL4-EcR$^{330-878}$ (Beispiel 3), die Rezeptorexpressionskassette 35S/VP16-RXR (Beispiel 8) und die Zielexpressionskassette $(GAL4)_{10}$-Bz1/Luc (Beispiel 10) in Maiszellen kotransformiert (Fig. 3). Transformierte Zellen wurden in Gegenwart von 10 µM Tebufenozid als chemischer Ligand für ca. 48 Stunden inkubiert. Luciferase-Assays wurden wie in Beispiel 12 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5

Chimärer Rezeptor	Gegenwart von Tebufenozid	Luciferase-Aktivität (Lichteinheiten)
35S/GAL4-EcR$^{330-878}$ + 35S/VP16-RXR	-	1032
35S/GAL4-EcR$^{330-878}$ + 35S/VP16-RXR	+	27954

[0111] Die obigen Ergebnisse zeigen, daß die 5'-regulatorische Region der Zielexpressionskassette, die die GAL4-Response-Elemente umfaßt, in Pflanzenzellen durch die Rezeptorpolypeptide GAL4-ECR$^{330-878}$ und VP16-RXR in Gegenwart eines komplementären chemischen Liganden aktiviert werden kann. Die Expressi-

onsstärke des Zielpolypeptids Luciferase war 27-fach oberhalb der in Abwesenheit von chemischem Liganden beobachteten. Dies zeigt, daß 1) das chimäre Rezeptorpolypeptid an die GAL4-Response-Elemente der Zielexpressionskassette band, 2) Tebufenozid an die Ligandenbindungsdomäne der $EcR^{330-878}$-Einheit im chimären Rezeptorpolypeptid band, 3) die zwei chimären Rezeptorpolypeptide angemessen heterodimerisierten und 4) die Heterodimerisierung die Transaktivierungsdomäne von VP16 in Position zur Aktivierung brachte.

BEISPIEL 18: Eine Transaktivierungsdomäne kann an jedem chimären Rezeptorpolypeptid verwendet werden

[0112] Unter Verwendung des Transformationsverfahrens aus Beispiel 12 wurden die Rezeptorexpressionskassette 35S/GAL4-$EcR^{330-825}$-C1 (Beispiel 6), die Rezeptorexpressionskassetten 35S/USP-VP16, 35S/VP16-USP (Beispiel 4), 35S/VP16-RXR (Beispiel 8) oder 35S/RXR-C1 (Beispiel 9) und die Zielexpressionskassette $(GAL4)_{10}$-Bz1/Luc (Beispiel 10) in Maiszellen kotransformiert. Transformierte Zellen wurden in Gegenwart von 10 µm Tebufenozid als chemischer Ligand für ca. 48 Stunden inkubiert. Luciferase-Assays wurden wie in Beispiel 12 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6

Chimärer Rezeptor	Gegenwart von Tebufenozid	Luciferase-Aktivität (Lichteinheiten)
35S/GAL4-$EcR^{330-825}$-C1 + 35S/VP16-USP	-	3423
35S/GAL4-$EcR^{330-825}$-C1 + 35S/VP16-USP	+	11069
35S/GAL4-$EcR^{330-825}$-C1 + 35S/USP-VP16	-	5972
35S/GAL4-$EcR^{330-825}$-C1 + 35S/USP-VP16 Experiment #2	+	37579
35S/GAL4-$EcR^{330-825}$-C1 + 35S/USP-VP16	-	40469
35S/GAL4-$EcR^{330-825}$-C1 + 35S/USP-VP16 Experiment #3	+	308366
35S/GAL4-$EcR^{330-825}$-C1 + 35S/USP-VP16	-	360537
35S/GAL4-$EcR^{330-825}$-C1 + 35S/USP-VP16 Experiment #4	+	5932306
35S/GAL4-$EcR^{330-825}$-C1 + 35S/VP16-RXR	-	64644
35S/GAL4-$EcR^{330-825}$-C1 + 35S/VP16-RXR Experiment #5	+	3762437
35S/GAL4-$EcR^{330-825}$-C1 + 35S/VP16-RXR	-	179209
35S/GAL4-$EcR^{330-825}$-C1 + 35S/VP16-RXR Experiment #6	+	7627276
35S/GAL4-$EcR^{330-825}$-C1 + 35S/RXR-C1	-	6748
35S/GAL4-$EcR^{330-825}$-C1 + 35S/RXR-C1	+	51910

[0113] Die obigen Ergebnisse zeigen, daß die 5'-regulatorische Region der Zielexpressionskassette $(GAL4)_{10}$-Bz1/Luc, die die GAL4-Response-Elemente umfaßt, in Pflanzenzellen durch die Rezeptorpolypeptide 35S/GAL4-$EcR^{330-825}$-C1 und 35S/VP16-USP, 35S/USP-VP16, 35S/VP16-RXR oder 35S/RXR-C1 in Gegenwart eines komplementären chemischen Liganden exprimiert werden kann. Die Expression des Zielpolypeptids wurde durch Gegenwart des Liganden von einige Male bis mehr als 50-fach erhöht.

BEISPIEL 19: Isolierung von Rezeptorpolypeptidmutanten mit verringerter Basisaktivität

[0114] Mutationen in der Ligandenbindungsdomäne sowohl des Ecdyson-Rezeptors (EcR) als auch des Ul-

traspiracle-Rezeptors (USP) wurden in vitro unter Verwendung von PCR-Mutagenese wie von Leung et al. beschrieben erzeugt, Technique 1: 11–15 (1989). PCR-Fragmente der mutierten EcR-Ligandenbindungsdomäne wurden in einen Hefeexpressionsvektor als Fusion mit der DNA-Bindungsdomäne von Hefe GAL4 kloniert. PCR-Fragmente von mutierter USP-Ligandenbindungsdomäne wurden in einen Hefeexpressionsvektor als Fusion mit der Transkriptionsaktivierungsdomäne von VP16 kloniert. Mutationskonstrukte wurden in den Hefe-GAL4-Reporterstamm GGY1::171 transformiert. Die Mutations-GAL4-EcR-Konstrukte wurden in Kombination mit nicht-mutagenisiertem VP16-USP transformiert, und Mutations-USP-V16-Konstrukte wurden in Kombination mit nicht-mutagenisiertem GAL4-$EcR^{330-825}$-C1 transformiert. Hefetransformanten wurden auf Medien ausplattiert, die den Indikator X-Gal enthielten. Mutanten mit einer verringerten Basisstärke der Rezeptorpolypeptidaktivität für das Heterodimer erzeugten weiße bis hellblaue Kolonien auf X-Gal-Indikatorplatten, während die nicht-mutagenisierten Rezeptorpolypeptidheterodimere dunkelblaue Kolonien erzeugten. Weiße bis hellblaue Kolonien wurden auf das Basisniveau und das durch chemischen Liganden induzierte Niveau der Rezeptorpolypeptidaktivität getestet, indem Hefezellen, die diese ausgewählten Kolonien darstellten, in synthetischen Medien (S-Medien) kultiviert wurden, die Glycerin, Ethanol und Galactose als Kohlenstoffquelle enthielten. Die resultierende Kultur wurde in zwei Teile aufgespalten, von denen einer mit einem entsprechenden chemischen Liganden behandelt wurde und der andere als Kontrolle in Abwesenheit von chemischem Liganden verwendet wurde. Nach Kontakt mit dem chemischen Liganden wurden sowohl der behandelte als auch der Kontrollteil der Kultur auf β-Galactosidaseaktivität gemäß dem Verfahren von Miller getestet (Experiments in Molecular Genetics, S. 352–355, J. H. Miller, Hrsg., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1972). Die Nukleotidsequenzen, die die Mutationsrezeptorpolypeptide codieren, durch diese Technik isoliert und identifiziert, waren Kandidaten für eine weitere Untersuchung, da sie in Pflanzenzellen eine verringerte Basisaktivität und eine mehrfache Induzierung der Zielgenexpression in Gegenwart des chemischen Liganden zeigen können.

BEISPIEL 20: Isolierung von Rezeptorpolypeptidmutanten mit verringerter Basiswechselwirkung

[0115] Mutationen in der Protein-Protein-Wechselwirkungsregion des neunten Heptade-Repeats der Ligandenbindungsdomäne des Thyroidhormonrezeptors und Retinolsäurerezeptors sollen eine erhöhte Abhängigkeit vom Liganden für die Heterodimerisierung mit ihrem gemeinsamen Partner RXR zeigen (Au-Fliegner et al., Mol. Cell Biol. 13: 5725 (1993)). Solche Mutationen in der konservierten Region des neuen Heptade-Repeats von EcR wurden nicht untersucht, aber könnten vielleicht die ligandenabhängige Transkriptionsaktivierung erhöhen. Zur Bestimmung, ob eine Mutation im neunten Heptade-Repeat von EcR zu einer größeren ligandenabhängigen Transkriptionsaktivierung führen würde, wurde das Leucin in Position 617 in EcR zu einem Arginin unter Verwendung von ortsgerichteter Mutagenese mit dem Oligonukleotid SF197 (5'-TTC TAC GCA AAG CGC CTC TCG ATC CTC-3'; SEQ ID NO: 16) verändert. Die resultierende veränderte codierende Sequenz wurde in ein exprimiertes GAL4-EcR-C1-Derivat wie in Beispiel 6 beschrieben rekonstruiert. Diese Rezeptorexpressionskassette wird als 35S/GAL4-EcR(L617R)-C1 bezeichnet.

BEISPIEL 21: Identifizierung von Mutationsrezeptorpolypeptiden mit verbesserter Funktion in Pflanzenzellen

[0116] Rezeptorexpressionskassetten, die die mutierten EcR- oder USP-Rezeptorpolypeptide der Beispiele 19 und 20 codieren, wurden gemäß den obigen Beispielen 1 bis 9 hergestellt. Diese Rezeptorexpressionskassetten in Kombination mit einer der Zielexpressionskassetten der Beispiele 10 und 11 wurden in Pflanzenzellen gemäß dem Verfahren aus Beispiel 12 transformiert. Transformierte Pflanzenzellen wurden auf Aktivierung der 5'-regulatorischen Region der Zielexpressionskassette durch die Mutationsrezeptorpolypeptide in Gegenwart eines entsprechenden chemischen Liganden untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7

Rezeptor	Gegenwart von chemischem Ligand	Luciferase-Aktivität (Lichteinheiten)
35S/GAL4-EcR$^{330-825}$-C1 + 35S/USP-VP16-Mutante 70-1-2-2	ohne	1915
35S/GAL4-EcR$^{330-825}$-C1 + 35S/USP-VP16-Mutante 70-1-2-2	Tebufenozid	11957
35S/GAL4-EcR$^{330-825}$-C1 + 35S/USP-VP16-Mutante 70-1-2-2	ohne	4281
35S/GAL4-EcR$^{330-825}$-C1 + 35S/USP-VP16-Mutante 70-1-2-2	Tebufenozid	25405
35S/GAL4-EcR$^{330-825}$-C1 + 35S/USP-VP16-Mutante 47-2-2-8	ohne	8490
35S/GAL4-EcR$^{330-825}$-C1 + 35S/USP-VP16-Mutante 47-2-2-8	Tebufenozid	145752
35S/GAL4-EcR$^{330-825}$-C1 + 35S/USP-VP16-Mutante 47-2-2-8	ohne	19032
35S/GAL4-EcR$^{330-825}$-C1 + 35S/USP-VP16-Mutante 47-2-2-8	Tebufenozid	329866
35S/GAL4-EcR(L614R)-C1 + 35S/USP-VP16	ohne	21675
35S/GAL4-EcR(L614R)-C1 + 35S/USP-VP16	Tebufenozid	745182
35S/GAL4-EcR(L614R)-C1 + 35S/USP-VP16	ohne	44030
35S/GAL4-EcR(L614R)-C1 + 35S/USP-VP16	Tebufenozid	1600287
35S/GAL4-EcR(L614R)-C1 + 35S/USP-VP16	ohne	102340
35S/GAL4-EcR(L614R)-C1 + 35S/USP-VP16	Tebufenozid	2632780
35S/GAL4-EcR(L614R)-C1 + 35S/USP-VP16	ohne	54630
35S/GAL4-EcR(L614R)-C1 + 35S/USP-VP16	Tebufenozid	2488780

[0117] Diese Ergebnisse zeigen, daß Mutationen innerhalb der Ligandenbindungsdomänen der EcR- oder USP-Rezeptoren zu Rezeptoren mit erhöhter ligandenabhängiger Expression eines Zielpolypeptids führen können.

BEISPIEL 22: Konstruktion von Vektoren zur Transformation von Arabidopsispflanzen, die EcR-, USP- oder RXR-Derivaten exprimieren und einen rezeptorregulierten Reporter tragen

[0118] T-DNA-Vektorplasmide aus Agrobakterium wurden aus den zuvor beschriebenen Plasmiden pGPTV-Kan und pGPTV-Hyg konstruiert (Becker et al., Plant Mol. Biol. 20: 1195–1197 (1992)). Das Sac2/HindIII-uidA-(GUS)-Reportergen sowohl des pGPTV-Kan- als auch des pGPTV-Hyg-Plasmids wurde durch den Sac2/HindIII-Polylinker aus pGEM4Zf(+), pSPORT1, pBluescriptKS(+), pIC20H oder pUC18 ausgetauscht, um die Plasmide pSGCFW, pSGCFX, pSGCFY, pSGCFZ, pSGCGA, pSGCGC, pSGCGD, pSGCGE, pSGCGF bzw. pSGCGG zu ergeben. Ein GAL4-regulierter Luciferase-Reporter als Zielexpressionskassette wurde als ein T-DNA-Agrobacterium-Plasmid konstruiert, indem zuerst ein 328 bp KpnI/HindIII-Fragment mit 10 GAL4-Bindungsorten und eine Mais-Bronze-1-TATA-Box wie in Beispiel 10 beschrieben in die KpnI/HindIII-Orte des modifizierten Luciferase-Reporterplasmids pSPLuc+ (Promega) subkloniert wurde, um Plasmid pSGCFO1 zu erzeugen. Ein 1,991 kb KpnI/XbaI-Fragment aus pSGCFO1, das den GAL4-Bindungsorte-Bz1-TATA-Luciferase-Reporter enthielt, wurde in einen T-DNA-Vektor über Ligation an ein 7194 NdeI/SpeI-Fragment von pSGCFX1 und ein 4111 NdeI/KpnI-Fragment von pSGCFZ1, oben beschrieben, subkloniert. Das resultierende Plasmid wurde als pSGCGL1 bezeichnet und trägt einen NPTII-selektierbaren Marker, der durch einen nos-Promotor angetrieben wird, was Resistenz gegen Kanamycin in der transgenen Pflanze verleiht, und einen GAL4-regulierten Luciferase-Reporter. Eine GAL4-regulierter GUS-Reporter mit 10 GAL4-Bindungsorten, einer 35S TATA-Region und einer GUS-codierenden Region wurde in einer ähnlichen Weise konstruiert und als pAT86 bezeichnet. Ein Direkt-Repeat-(DR)-Response-Elementreporter mit drei Kopien des DR-Response-Elements, einem Bz1 TATA, einer Luciferase-codierenden Region und einem nos-Terminator wurde ebenfalls in einer der für pSGCGL1 beschriebenen ähnlichen Weise konstruiert und als pSGCHU1 bezeichnet. Die in den obigen Beispielen 3 bis 9 beschriebenen Rezeptorexpressionskassetten wurden zur Konstruktion analoger Agrobacterium-T-DNA-Konstrukte verwendet, die den CaMV 35S-Promotor und die nos-Polyadenylierungssignale tragen.

BEISPIEL 23: Erzeugung von transgener Arabidopsis, die ein EcR- und USP- (oder RXR-) Derivat exprimiert und einen regulierten Luciferase-Reporter trägt

[0119] Arabidopsis thaliana (Columbia) wurde mit Agrobacterium-Vektoren, die einen ligandenregulierten Luciferasereporter und entsprechende Rezeptorexpressionskassetten-Derivate tragen, durch das folgende Vakuuminfiltrationsverfahren transformiert. Elektrokompetente GV3101-Agrobacterium-Zellen wurden durch Inkubieren von GV3101 Agrobacterium in 2 × YT-Medium bei 28°C mit Belüftung für 24–30 Stunden auf ein OD_{600} von 0,5–0,7 Einheiten hergestellt. Die Zellen wurden auf Eis für 10–30 Minuten gekühlt und mit 5000 U/min für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 Volumen von eiskaltem 10%igem Glycerin resuspendiert. Die Zellen wurden erneut mit 5000 U/min für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 0,05 Volumina von eiskaltem 10%igem Glycerin resuspendiert. Die Zellen wurden erneut mit 5000 U/min für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 0,02 Volumina von eiskaltem 10%igem Glycerin resuspendiert. Die Zellen wurden erneut mit 5000 U/min für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 0,02 Volumina von eiskaltem 10%igem Glycerin resuspendiert. Die Zellen wurden erneut mit 5000 U/min für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 0,01 Volumina von eiskaltem 10%igem Glycerin resuspendiert. Die Zellen wurden in 2000 µl-Mengen pro 1,5 ml-Mikrozentrifugenröhrchen aufgeteilt, in flüssigem N_2 tiefgefroren und bei –80°C gelagert. Eingefrorene elektrokompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 40 µl in ein vorgekühltes 1,5 ml-Mikrozentrifugenröhrchen überführt. 1 µl der entsprechenden Agrobacterium-Plasmid-DNA (2–10 ng) wurde zu den aufgetauten Zellen hinzugegeben und auf Eis vermischt. Die Zell/Plasmid-Mischung wurde in eine vorgekühlte 0,2 cm Bio-Rad-Elektroporationsküvette überführt und mit 2,0 kV, 600 Ohm, 25 µF mit einer 6 ms-Zeitkonstante elektroporiert. 1 ml von 2-X YT-Medium wurde zur Elektroporationsküvette hinzugegeben, die Zell/Plasmid-Lösung wurde mit einer Pipettenspitze vermischt und der Inhalt in ein frisches 1,5 ml-Mikrozentrifugenröhrchen übertragen. Die Zellen wurden dann bei 37°C für 1 Stunde auf einem Schüttler mit 200 U/min inkubiert. Die Zellen wurden für 2 Minuten bei einer Einstellung von 6 in einer Eppendorf-Mikrozentrifuge mit einstellbarer Geschwindigkeit auszentrifugiert, der Überstand abdekantiert und das Zellpellet in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert.

[0120] Resuspendierte Zellen wurden auf einer Platte mit LB-Medium, das Kanamycin enthielt, ausgebreitet. Die Platten wurden bei 28–30°C für 2–3 Tage inkubiert. 50 ml der LB-Kultur wurden mit einer einzelnen transformierten Kolonie in einem 250 ml-Kolben mit Rifampicin mit 100 µg/ml und Gentamycin mit 25 µg/ml und Kanamycin mit 100 µg/ml geimpft. Die Kultur wurde für 24–36 Stunden bei 28°C mit 250 U/min inkubiert, und 10 ml der Kultur wurden verwendet, um 500 ml LB + Antibiotika in einem 2 l-Kolben zu impfen. Diese Kultur wurde über Nacht bei 28°C unter Schütteln mit 250 U/min inkubiert. Plasmid-DNA wurde aus dieser Agrobacteri-

um-Kultur isoliert und durch Restriktionsanalyse verifiziert.

[0121] Arabidopsis-Pflanzen wurden in mit Netz bedecktem Boden in Plastiktöpfen mit 3 Quadratzoll in einem auf 16 Stunden Licht, 18 Stunden Dunkelheit, 20°C eingestellten Phytotron für 4 bis 5 Wochen kultiviert. Die Pflanzen wurden kultiviert, bis das Blütenmeristem ca. 2 Zoll hoch war. Zu transformierende Blütenmeristeme von Arabidopsis-Pflanzen wurden zwei Tage vor dem Kontakt mit Agrobakterium entfernt. Die Agrobakterium-Kultur wurde mit 5000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert und das resultierende Pellet in 500 ml Infiltrationsmedium (4,3 g MS-Salze/l, 5% Saccharose, 0,01 mg/ml Benzylaminopurin, 100 ml/l Silwet L77, pH 5,8) resuspendiert. Arabidopsis-Pflanzen wurden im Wasser getränkt, um den Boden zu sättigen. 500 ml der bakteriellen Zellsuspension wurden auf den Boden eines sterilen Vakuumexsikkators übertragen, und die Arabidopsis-Pflanzen in ihren Töpfen wurden mit der Spitze nach unten in die Agrobacterium-Lösung plaziert. Vakuum wurden an den Exsikkator für 5 Minuten angelegt und dann langsam abgelassen. Diese Vakuumbehandlung wurde dreimal wiederholt, die Pflanzen wurden von überschüssigem Agrobacterium abgespült und in die Wachstumskammer zurückgegeben. Die vakuuminfiltrierten Pflanzen wurden reifen, blühen und Samen erzeugen gelassen. Das resultierende Saatgut wurde weiter in einem Trocknungsraum mit geringer Feuchtigkeit bei 95°F für ca. 5 bis 10 Tage getrocknet. Das Saatgut wurde aus den getrockneten Blüten durch Zerdrücken entfernt und dann durch ein Sieb mit 425 µm mesh gefiltert. Ca. 240 mg Saatgut wurden durch Zugabe zu 1 ml von 70%igem EtOH sterilisiert, sorgfältig verwirbelt und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Saatgut wurde kurz bei hoher Geschwindigkeit in einer Eppendorf-Microfuge zentrifugiert, und der Überstand wurde entfernt. Pelletiertes Saatgut wurde in 1 ml Sterilisationspuffer (1 Teil 10%iges Triton X-100, 10 Teile Bleiche, 20 Teile doppelt destilliertes H_2O) resuspendiert, verwirbelt und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Das Saatgut wurde kurz mit hoher Geschwindigkeit in einer Eppendorf-Microfuge zentrifugiert, und der Überstand wurde abdekantiert. Das Saatgut wurde in 1 ml sterilem doppelt destilliertem H_2O resuspendiert, verwirbelt und mit hoher Geschwindigkeit in einer Microfuge zentrifugiert und der Überstand entfernt. Dieser Waschschritt wurde dreimal wiederholt, dann wurde das Saatgut in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen für eine letzte Spülung in 5 ml doppelt destilliertem H_2O überführt. Das Saatgut wurde kurz mit höchster Geschwindigkeit in einer Beckman-Labortischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert, und das Saatgut wurde in 24 ml steriler 0,8%iger LMP-Agarose bei 50°C resuspendiert, vermischt und zu 8 ml auf drei 150 mm GM-Platten verteilt, die Antibiotikum zur Selektion (entweder 50 µg/ml Kanamycin oder 50 µg/ml Hygromycin) und 500 µg/ml Carbenicillin enthielten. Das ausplattierte Saatgut wurde bei 4°C im Dunkeln für 24 h, dann bei 20°C mit 16 Stunden Licht, 8 Stunden Dunkelheit im Zyklus pro Tag inkubiert. Gekeimte Sämlinge wurden auf Platten für 5–10 Tage selektiert, Pflänzchen wurden auf frische Selektionsplatten transplantiert und auf Boden nach 5–10 Tagen weiterer Selektion transplantiert. Frisch transplantierte Pflänzchen wurden mit Kunststoffabdeckung für 2–3 Tage bedeckt, dann bis zum Beginn der Blütenmeristeme kultiviert.

BEISPIEL 24: Heranziehen von Nachkommenschaft der transgenen Pflanzen

[0122] Transformierte Pflanzen von Arabidopsis thaliana (Columbia), die in Beispiel 23 hergestellt wurden, werden in mit Netz bedecktem Boden in Kunststofftöpfen mit 3 Quadratzoll in einem auf 16 Stunden Licht, 8 Stunden Dunkelheit, 20°C eingestellten Phytotron für 4–5 Wochen kultiviert. Die Pflanzen enthalten in ihr Genom integrierte Fremd-DNA in Form der Rezeptor- und Zielexpressionskassetten gemäß der Erfindung. Die ingetrierte DNA wird von einer Pflanzengeneration auf die nächste durch den Prozeß der Befruchtung als Konsequenz des Lebenszyklus der transformierten Pflanze übertragen.

[0123] Die Befruchtung ist ein Prozeß, durch den der männliche Gametophyt und die sporophytischen oder gametophytischen weiblichen Gewebe wechselwirken, um die erfolgreiche Erzeugung einer Zygote zu erreichen. Reife Pollenkörner werden in den Staubbeuteln der Blüte erzeugt und auf der Oberfläche der Narbe abgelegt (Bestäubung), wo sie hydratisieren und keimen, um einen Pollenschlauch zu entwickeln. Die Samenzellen im Pollenschlauch werden in den in der Eizelle (Gynoecium) vorhandenen Embryosack übertragen, wo die tatsächlichen Ereignisse der Befruchtung (Gametenverschmelzung) stattfinden, um die Zygote zu erzeugen. Die Zygote in Form eines Samens ist die Realisierung der nächsten Generation einer Pflanzenlinie. Diese nächste Generation wird als "Nachkommenschaft" der transformierten Pflanze bezeichnet.

[0124] Die Nachkommenschaft kann durch Selbstbefruchtung gebildet werden, worin der männliche Gametophyt und weibliches gametophytisches Gewebe aus der gleichen individuellen Pflanze entstehen. Dies bedeutet, daß eine einzelne Pflanze die Quelle der genomischen DNA für die nächste Generation ist. Alternativ kann Nachkommenschaft durch Kreuzbefruchtung zweier separater Pflanzen erzeugt werden, indem der männliche Gametophyt aus einer Pflanze mit den weiblichen sporophytischen Geweben einer separaten Pflanze in Kontakt gebracht wird, um die nächste Generation von Pflanzen zu erzeugen. In diesem Fall stammt die genomische DNA der Nachkommenschaft aus zwei separaten Pflanzen. Wenn außerdem eine transformierte

Pflanze mit einer nicht-transformierten Pflanze kreuzbefruchtet wird, ist die genomische DNA der Nachkommenschaft aus transgener genomischer DNA aus einer Pflanze und nicht-transgener genomischer DNA aus einer separaten Pflanze zusammengesetzt. Unabhängig davon, ob die Nachkommenschaft der transformierten Pflanze durch Selbstbefruchtung oder Kreuzbefruchtung erzeugt wird, werden einige der Nachkömmlinge eine ungleiche genetische Verteilung aufgrund der Gegenwart der im Genom integrierten Fremd-DNA erhalten. Diese ungleiche genetische Verteilung kann unter Verwendung der Techniken der klassischen Genetik und Molekularbiologie festgestellt werden.

[0125] Zur Erzeugung der nächsten Generation von Pflanzen, die die erfindungsgemäßen Rezeptor- und Zielexpressionskassetten enthalten, läßt man die ursprünglich transformierten Pflanzen reifen, blühen und Samen unter kontrollierten Umweltbedingungen erzeugen. Das resultierende Saatgut wird weiter in einem Trocknungsraum mit geringer Feuchtigkeit bei 95°F für ca. 5–10 Tage getrocknet. Das Saatgut wird aus den getrockneten Blüten durch Zerdrücken der Schoten und anschießendes Filtrieren durch ein Sieb mit 425 µm Mesh entfernt, um das Saatgut von anderem Pflanzenmaterial zu trennen. Das Saatgut kann dann zum Heranziehen weiterer Generationen von Pflanzen verwendet werden.

[0126] Dieser Prozeß der Erzeugung einer nächsten Generation von transformierten Pflanzen, obwohl für Arabidopsis beschrieben, ist allgemein anwendbar auf alle bedecktsamigen Pflanzen mit in ihr Genom integrierten erfindungsgemäßen Rezeptor- und Zielexpressionskassetten.

[0127] Alle in dieser Beschreibung genannten Veröffentlichungen und Patentanmeldungen sind indikativ für den Qualifikationsgrad der Fachleute, an die sich diese Erfindung richtet.

[0128] Obwohl die vorhergehende Erfindung in einigem Detail durch Erläuterungen und Beispiele für die Zwecke der Klarheit des Verständnisses beschrieben wurde, wird es offensichtlich sein, daß gewisse Veränderungen und Modifikationen innerhalb des Umfangs der anliegenden Patentansprüche durchgeführt werden können.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:
(A) NAME: CIBA-GEIGY AG
(B) STRASSE: Klybeckstr. 141
(C) ORT: Basel
(E) LAND: Schweiz
(F) POSTLEITZAHL: 4002
(G) TELEFON:+41 61 69 11 11
(H) TELEFAX: +41 61 696 79 76
(I) TELEX: 962 991

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: Kontrolle der Genexpression in Pflanzen durch rezeptorvermittelte Transaktivierung in Gegenwart eines chemischen Liganden

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 18

(v) COMPUTERLESBARE FASSUNG:
(A) DATENTRÄGER: Diskette
(B) COMPUTER: IBM-PC-kompatibel
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Ausgabe #1.0, Version #1.30B

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 42 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid SF43"

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:1:

CGCGGATCCT AAACAATGAA GCGGCGCTGG TCGAACAACG GC 42

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 34 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid SF23"

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:2:

CGCGGGATCC ATGCGGCCGG AATGCGTCGT CCCG 34

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 30 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid SF42"

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:3:

CGCGGATCCA TGGACAACTG CGACCAGGAC 30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 29 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid SF37"

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:4:

GCGGGATCCC CCACCGTACT CGTCAATTC 29

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 45 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid SA115"

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:5:

GTCGAGCTCT CGGATCCTAA AACAATGGCC CCCCCGACCG ATGTC 45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 29 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid SF25"

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:6:

GATCCGACAA GGGTTCAATG CACTTGTCA 29

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 29 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid SF26"

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:7:

GATCTGACAA GTGCATTGAA CCCTTGTCG 29

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:8:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 35 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid SF30"

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:8:

CGCGGATCCA TGGGTCGCGA TGATCTCTCG CCTTC 35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENZCHARAK11 11 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
(B) LAGE: 1..11
(D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "Polylinker zur Verbindung der Cl-Transaktivierungsdomäne mit EcR verwendet"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:9:

VGSRSRVSSH A 11

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:10:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 26 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "positiver Strang des Oligonukleotids zur Schaffung von pSKGAL2.3 verwendet"

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:10:

CGGGGGATCC TAAGTAAGTA AGGTAC 26

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:11:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "komplementärer Strang des Oligonukleotids zur Schaffung von pSKGAL2.3 verwendet"

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:11:

CTTACTTACT TAGGATCCCC 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:12:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 29 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid SF165"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:12:

CGCGGATCCA TGGACACCAA ACATTTCCT 29

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:13:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 36 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid SF167"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:13:

CGCGGAATTC TAAACAATGG ACACCAAACA TTTCCT 36

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:14:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 31 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid SF170"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:14:

CGCAGATCTG GGTGGCTTGA TGTGGTGCCT C 31

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:15:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid SF168"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:15:

CTCTTCACTC TTGTGGAGTG 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:16:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 27 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid SF197"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:16:

TTCTACGCAA AGCGCCTCTC GATCCTC 27

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:17:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 17 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid NEB1211"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:17:

GTAAAACGAC GGCCAGT 17

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:18:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 32 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonukleotid SF140"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:18:

CGCAGATCTT GGACGAGCCG TGCTTCTCCG GC 32

Patentansprüche

1. Transgene Pflanzenzelle oder Pflanze und Nachkommenschaft davon, umfassend:
(a) eine erste Rezeptor-Expressionskassette, die ein erstes Klasse-II-Rezeptorpolypeptid der Steroid- und Thyroidhormon-Superfamilie von Kernrezeptoren codiert, umfassend eine erste Ligandenbindungsdomäne;
(b) eine zweite Rezeptor-Expressionskassette, die ein zweites Klasse-II-Rezeptorpolypeptid der Steroid- und

Thyroidhormon-Superfamilie von Kernrezeptoren codiert, umfassend eine zweite Ligandenbindungsdomäne; und
(c) eine Zielexpressionskassette, die ein Zielpolypeptid codiert.

2. Pflanzenzelle oder Pflanze gemäss Anspruch 1, worin die Zielexpressionskassette ein Zielpolypeptid codiert, das die pflanzliche Fruchtbarkeit beeinträchtigt.

3. Verfahren zur Herstellung einer Pflanzenzelle oder Pflanze gemäss Anspruch 1, umfassend das Transformieren einer Pflanzenzelle oder Pflanze mit
(a) einer ersten Rezeptor-Expressionskassette, die ein erstes Klasse-II-Rezeptorpolypeptid der Steroid- und Thyroidhormon-Superfamilie von Kernrezeptoren codiert, umfassend eine erste Ligandenbindungsdomäne;
(b) einer zweiten Rezeptor-Expressionskassette, die ein zweites Klasse-II-Rezeptorpolypeptid der Steroid- und Thyroidhormon-Superfamilie von Kernrezeptoren codiert, umfassend eine zweite Ligandenbindungsdomäne; und
(c) einer Zielexpressionskassette, die ein Zielpolypeptid codiert.

4. Verfahren gemäss Anspruch 3, das zusätzlich das Erhalten von Nachkommenschaft der Pflanzenzellen oder Pflanzen umfasst, die mit den Expressionskassetten transformiert wurden.

5. Pflanze gemäss Anspruch 1 oder 2, worin die Pflanze Mais ist.

6. Pflanze gemäss Anspruch 1 oder 2, worin die Pflanze Weizen ist.

7. Verfahren zur Steuerung der Genexpression in einer Pflanze gemäss Anspruch 1, umfassend:
(a) Exprimieren der ersten und zweiten Rezeptorpolypeptide in der Pflanze; und
(b) Inkontaktbringen der Pflanze mit einem oder mehreren chemischen Liganden, die komplementär zur Ligandenbindungsdomäne der ersten oder zweiten Rezeptorpolypeptide sind, wobei die Rezeptorpolypeptide in Gegenwart des chemischen Liganden die Expression des Zielpolypeptids aktivieren.

8. Verfahren gemäss Anspruch 7, worin das erste Rezeptorpolypeptid der Ecdyson-Rezeptor ist.

9. Verfahren gemäss Anspruch 8, worin das erste Rezeptorpolypeptid ferner eine heterologe Transaktivierungsdomäne umfasst.

10. Verfahren gemäss Anspruch 9, worin die heterologe Transaktivierungsdomäne die Transaktivierungsdomäne aus dem C1-regulatorischen Gen von Mais ist.

11. Verfahren gemäss Anspruch 8, worin das erste Rezeptorpolypeptid ferner eine heterologe DNA-Bindungsdomäne umfasst.

12. Verfahren gemäss Anspruch 11, worin die DNA-Bindungsdomäne die DNA-Bindungsdomäne aus dem GAL4-Protein von Hefe ist.

13. Verfahren gemäss Anspruch 7, worin das zweite Rezeptorpolypeptid Ultraspiracle ist.

14. Verfahren gemäss Anspruch 13, worin das zweite Rezeptorpolypeptid ferner eine heterologe Transaktivierungsdomäne umfasst.

15. Verfahren gemäss Anspruch 14, worin die heterologe Transaktivierungsdomäne die Transaktivierungsdomäne aus dem VP16-Protein von Herpes simplex ist.

16. Verfahren gemäss Anspruch 7, worin das erste oder zweite Rezeptorpolypeptid in der Ligandenbindungsdomäne so mutiert wurde, dass die mutierte Ligandenbindungsdomäne nur den einen oder die mehreren chemischen Liganden erkennt, mit denen die Pflanze in Schritt (b) in Kontakt gebracht wird.

17. Verfahren gemäss Anspruch 7, worin der chemische Ligand ein Insektenhormon, ein Insektenhormon-Antagonist oder ein Insektenhormon-Agonist ist.

18. Verfahren gemäss Anspruch 17, worin der chemische Ligand Fenoxycarb, CGA 59,205, Tebufenazin oder RH 5849 ist.

19. Verfahren gemäss Anspruch 7, worin die Zielexpressionskassette eine 5'-regulatorische Region umfasst, die ferner zwischen 1 und 11 Kopien eines Response-Elements umfasst.

20. Verfahren zur Steuerung der Fruchtbarkeit einer Pflanze gemäss Anspruch 2, umfassend:
(a) Exprimieren der ersten und zweiten Rezeptorpolypeptide in der transformierten Pflanze; und
(b) Inkontaktbringen der transformierten Pflanze mit einem oder mehreren chemischen Liganden, die komplementär zur Ligandenbindungsdomäne der ersten oder zweiten Rezeptorpolypeptide sind, wobei die Rezeptorpolypeptide in Gegenwart des chemischen Liganden die Expression des Zielpolypeptids aktivieren.

21. Verfahren gemäss Anspruch 20, worin wenigstens eine der Rezeptor-Expressionskassetten einen Staubbeutel-spezifischen Promotor umfasst, der funktionsfähig mit der codierenden Sequenz für das Rezeptorpolypeptid verbunden ist.

22. Verfahren gemäss Anspruch 20, worin wenigstens eine der Rezeptor-Expressionskassetten einen Stempel-spezifischen Promotor umfasst, der funktionsfähig mit der codierenden Sequenz für das Rezeptorpolypeptid verbunden ist.

23. Verfahren gemäss Anspruch 20, worin die Expression des Zielpolypeptids die pflanzliche Fruchtbarkeit reduziert.

24. Verfahren gemäss Anspruch 23, worin das Zielpeptid die Ribonuklease Barnase ist.

25. Verfahren gemäss Anspruch 20, worin die Zielexpressionskassette die Antisense-Version einer für die Befruchtung kritischen codierenden Sequenz codiert.

26. Verfahren gemäss Anspruch 20, worin die Expression des Zielpolypeptids die pflanzliche Fruchtbarkeit erhöht.

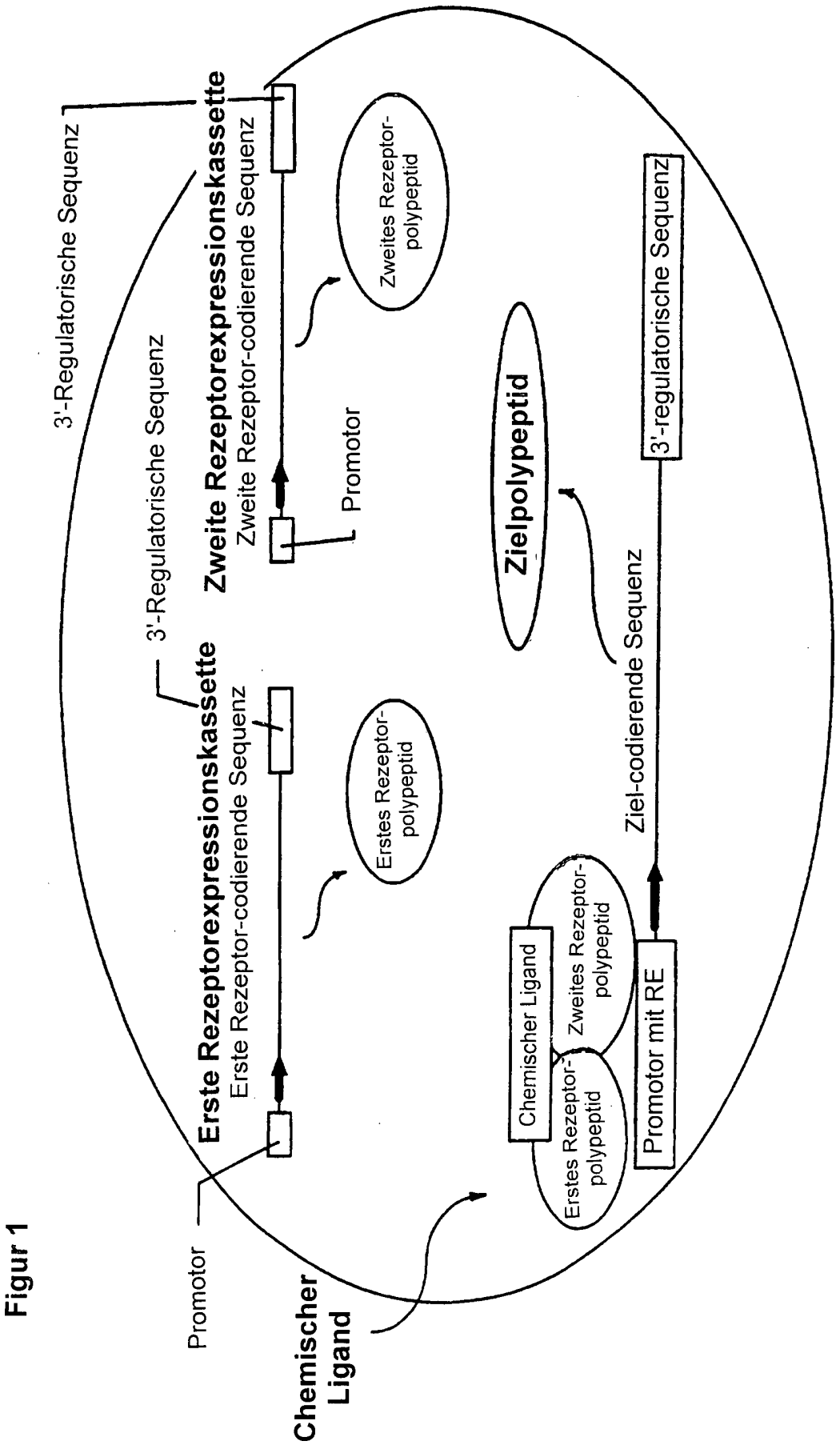
27. Verfahren gemäss Anspruch 26, worin das Zielpolypeptid der Ribonukleaseinhibitor Barstar ist.

28. Verwendung der Pflanze gemäss Anspruch 1 zur Induzierung der Expression des Zielpolypeptids durch ein Insektenhormon, einen Insektenhormon-Antagonisten oder einen Insektenhormon-Agonisten.

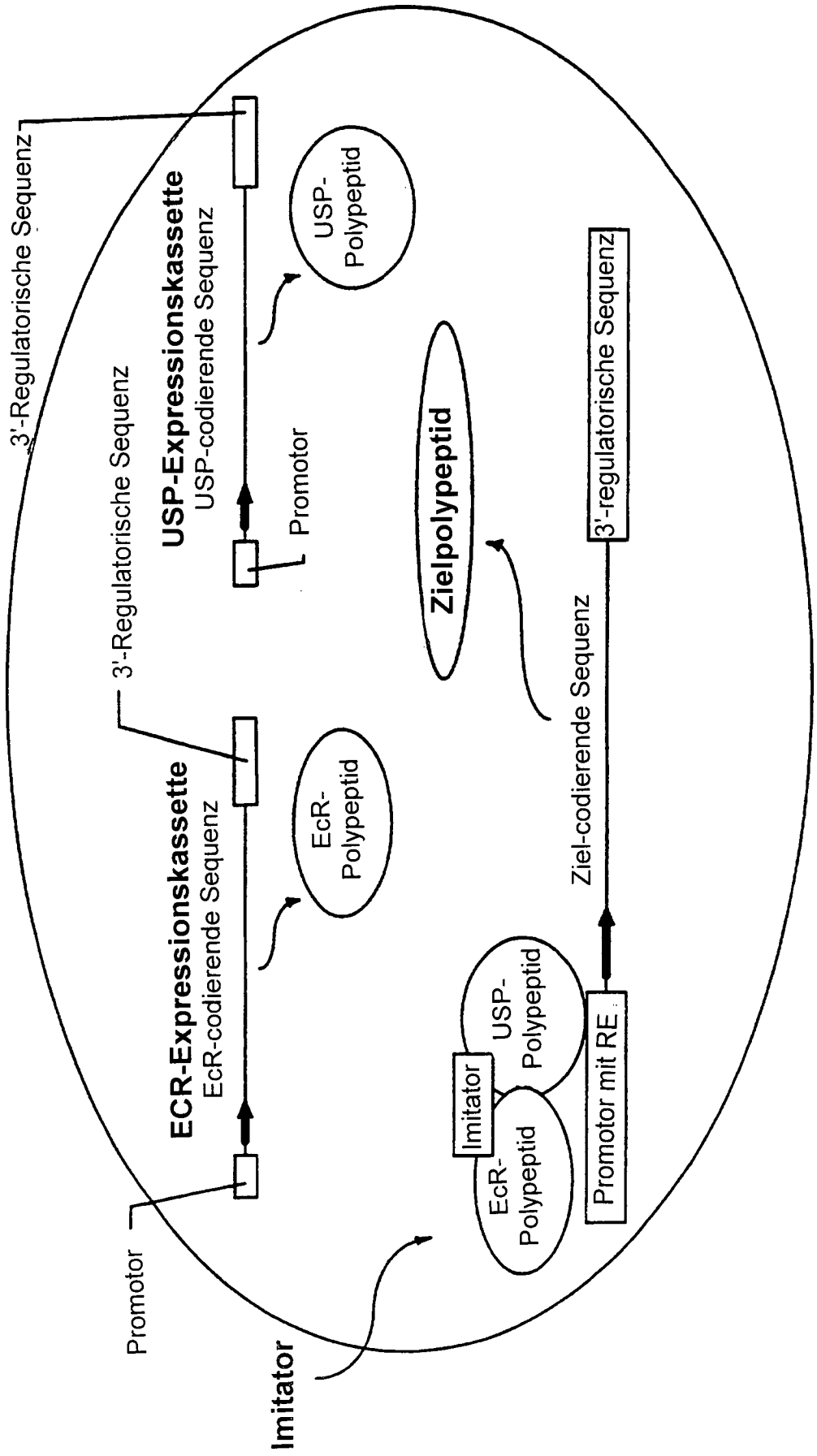
29. Verwendung der Pflanze gemäss Anspruch 2 zur Steuerung der pflanzlichen Fruchtbarkeit.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

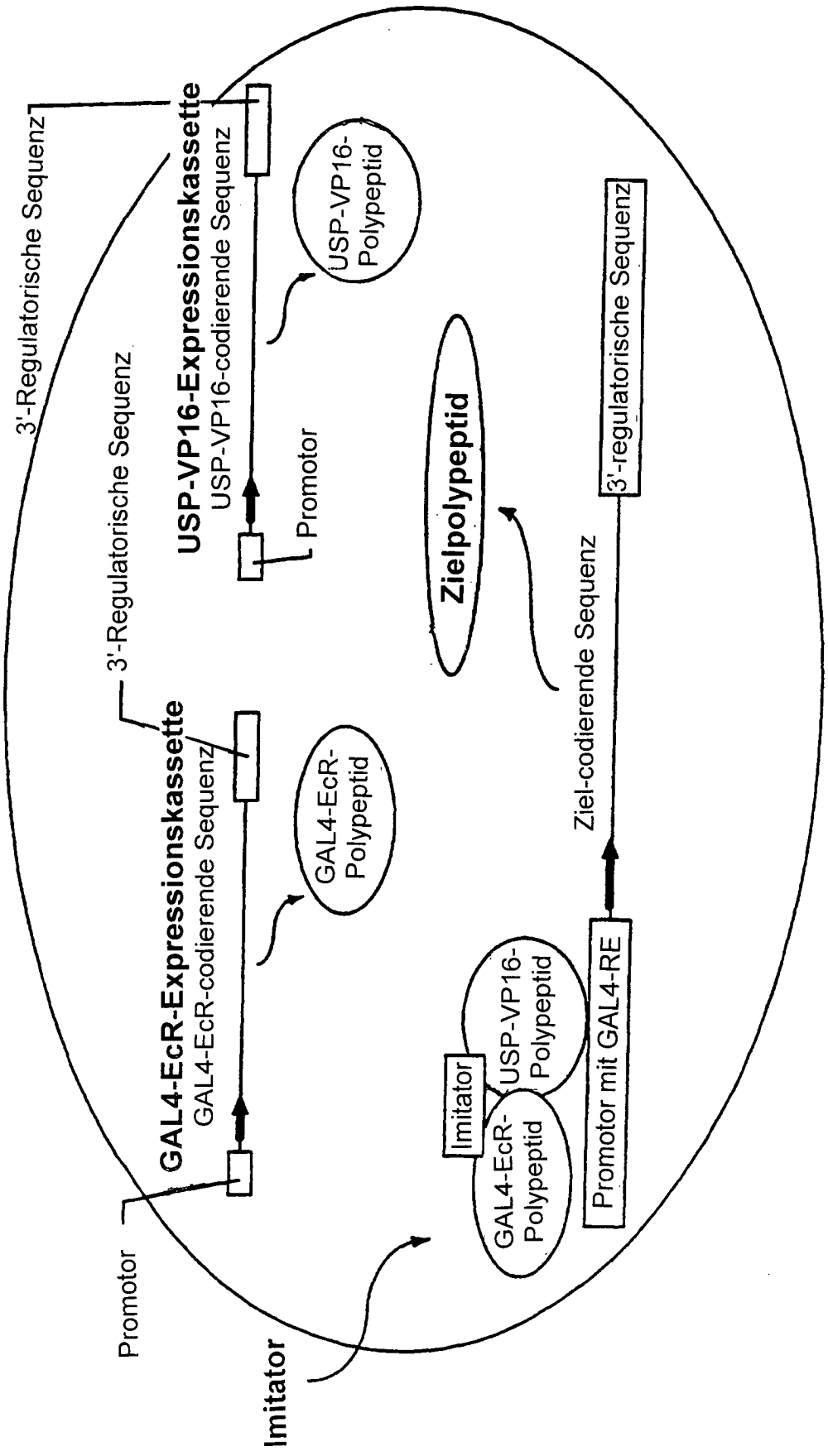
Anhängende Zeichnungen



Figur 1


3'-Regulatorische Sequenz
USP-Expressionskassette
USP-codierende Sequenz
Promotor
USP-Polypeptid
3'-Regulatorische Sequenz
ECR-Expressionskassette
EcR-codierende Sequenz
EcR-Polypeptid
Zielpolypeptid
Ziel-codierende Sequenz
3'-regulatorische Sequenz
Promotor
Imitator
EcR-Polypeptid
Imitator
USP-Polypeptid
Promotor mit RE

Figur 2


3'-Regulatorische Sequenz
USP-VP16-Expressionskassette
USP-VP16-codierende Sequenz
Promotor
USP-VP16-Polypeptid
3'-Regulatorische Sequenz
GAL4-EcR-Expressionskassette
GAL4-EcR-codierende Sequenz
GAL4-EcR-Polypeptid
Zielpolypeptid
Ziel-codierende Sequenz
3'-regulatorische Sequenz
Promotor
Imitator
GAL4-EcR-Polypeptid
Imitator
USP-VP16-Polypeptid
Promotor mit GAL4-RE

Figur 3