

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
16. August 2001 (16.08.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/59139 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12N 15/82**
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/01411
- (22) Internationales Anmeldedatum:
9. Februar 2001 (09.02.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
100 06 204.0 11. Februar 2000 (11.02.2000) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **GSF-FORSCHUNGSZENTRUM FÜR UMWELT UND GESUNDHEIT GMBH** [DE/DE]; Ingolstädter Landstrasse 1, 85764 Neuherberg (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **CHIRON, Hélène** [FR/FR]; 22, rue Beranger, F-38360 Sassenage (FR). **DROUET, Alain** [FR/FR]; 2107, rue de la Source, F-45160 Olivet (FR). **ERNST, Dieter** [DE/DE]; Am Schlosspark 28, 82131 Gauting (DE). **SANDERMANN, Heinrich** [DE/DE]; Rottenbucherstrasse 36, D-81377 München (DE).
- (74) Anwalt: **MAIWALD, Walter**; Maiwald Patentanwalts GmbH, Elisenhof, Elisenstrasse 3, 80335 München (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:**
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: OZONE AND/OR PATHOGEN-INDUCIBLE GENE EXPRESSION IN PLANTS

(54) Bezeichnung: OZON- UND/ODER PATHOGEN-INDUZIERBARE GENEXPRESSION IN PFLANZEN

(57) Abstract: The invention relates to recombinant nucleic acid molecules that comprise plant defense genes, as well as promoters that mediate a pathogen and/or ozone-inducible gene expression. The invention further relates to a method for producing new plants that contain said nucleic acid molecules or fragments thereof, to the corresponding new plants and to the use of the promoters for inducing pathogen and/or ozone-responsive gene expression in plants and plant cells.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft rekombinante Nukleinsäuremoleküle, die pflanzliche Abwehrgene umfassen, sowie Promotoren, die eine durch Pathogene und/oder Ozon induzierbare Genexpression vermitteln. Ferner betrifft die Erfindung Verfahren zur Erzeugung neuer Pflanzen, die diese Nukleinsäuremoleküle oder Fragmente davon enthalten, diese neuen Pflanzen sowie die Verwendung der Promotoren zur Erzeugung Pathogen- und/oder Ozon-responsiver Genexpression in Pflanzen und Pflanzenzellen.

WO 01/59139 A2

Ozon- und/oder Pathogen-induzierbare Genexpression in Pflanzen

Die Erfindung betrifft rekombinante Nukleinsäuremoleküle, die pflanzliche
5 Abwehrgene umfassen, sowie Promotoren, die eine durch Pathogene und/oder Ozon
induzierbare Genexpression vermitteln. Ferner betrifft die Erfindung Verfahren zur
Erzeugung neuer Pflanzen, die diese Nukleinsäuremoleküle oder Fragmente davon
enthalten, diese neuen Pflanzen sowie die Verwendung der Promotoren zur
Erzeugung Pathogen- und/oder Ozon-responsiver Genexpression in Pflanzen und
10 Pflanzenzellen.

Stilbenen wurde schon früh eine antibakterielle und fungitoxische Wirkung
zugesprochen. Sie finden sich in einigen nicht miteinander verwandten
Pflanzenfamilien, jedoch nur selten in wichtigen Kulturpflanzen. In der Kiefer (*Pinus*
15 *sylvestris*) treten die konstitutiven Stilbene Pinosylvin (PS; 3,5-Dihydroxystilben)
und Pinosylvinmonomethylether (PSM) ausschließlich im Kernholz auf (H. Kindl
(1985), Biosynthesis of stilbenes in: Biosynthesis and Biodegradation of Wood
Components (Hrsgb.: T. Higuchi), Academic Press, London, 349-377). Die Synthese
dieser beiden Verbindungen wird allerdings in den Trieben, dem Phloem und den
20 Nadeln als Antwort auf Verwundung oder den Angriff von Pilzen induziert (J.H.
Hart (1981), Annu. Rev. Phytopathol. 19, 437-458; Kindl, supra; Lieutier et. al.
(1996), Eur. J. For. Path. 26, 145-158).

Die Stilbene lassen sich allgemein in konstitutive Verbindungen zum Schutz des
25 Holzabbaus vor Mikroorganismen und in induzierte Phytoalexine, die das Phloem
gegen Borkenkäfer und andere Insekten sowie gegen mit Käfern symbiotisch
assoziierten Pilze schützen, einteilen (Hart, supra; Lieutier, supra). Der Stoffwechsel
zu Methoxystilbenen geht von L-Phenylalanin aus und umfasst die Aktivitäten der
Enzyme Phenylalaninammoniumlyase (PAL), Stilbensynthase (STS) und Pinosylvin-
30 3-O-methyltransferase (PMT). Es wurde gezeigt, dass die STS-Aktivität der
limitierende Faktor im Metabolismus zu PS und PSM ist (S. Schanz et al. (1992),

FEBS 313, 71-74). Änderungen in der Genexpression von STS und/oder PMT beeinflussen somit voraussichtlich entscheidend die induzierte Resistenz von Pflanzen durch als Phytoalexine wirkende Stilbenoide.

- 5 Es ist bekannt, daß Pflanzen vor verschiedenen Streßfaktoren durch PSM wesentlich effizienter geschützt werden als durch PS. Beispiele hierfür sind der Schutz vor pathogenen Organismen wie beispielsweise Pilzen (Lieutier, supra) und der Schutz gegen Ozon (Rosemann et al. (1991), Plant Physiol. 97, 1280-1286), wobei PSM wesentlich stärker antimikrobiell wirksam ist als PS, die analoge Verbindung zu
- 10 Resveratrol, einem weiteren Stilben. Des weiteren ist bekannt, daß die Pinosylvin-3-O-methyltransferase (PMT) durch Ozon wesentlich stärker induzierbar ist als die Stilbensynthase (STS) (Trost, Dissertation LMU München, 1994). Somit ist die Regulation der Aktivität der Pinosylvin-3-O-methyltransferase von wesentlicher biologischer und wirtschaftlicher Bedeutung.
- 15 Methyltransferasen sind an sich bekannt. Sie katalysieren die Übertragung von Methylgruppen von einer Verbindung auf eine andere. Bekannt sind ferner pflanzliche O-Methyltransferasen, die eine Methylierung des Sauerstoffatoms bewirken. Beispiele hierfür sind die O-Methyltransferase aus *Pinus radiata* (Acc. No. U70873) die Kaffeesäure-O-Methyltransferase aus *Pinus taeda* (Acc. No. U39301) die Catechol-O-methyltransferase aus *Nicotiana tabacum* (Acc. No. X74452) sowie die Lignin-bispezifische Säure/5-Hydroxyferulasäure-O-methyltransferase aus *Populus tremoides* (Acc. No. X62096).
- 20
- 25 DNA-Sequenzen, die für Stilbensynthaseenzyme, d.h. die Synthese von Stilbenen wie Resveratrol bzw. Pinosylvin katalysierende Enzyme, codieren, sind beispielsweise in der europäischen Patentschrift EP 0 309 862, der deutschen Patentanmeldung DE-A-41 07 396, der europäischen Patentanmeldung EP 0 464 461

sowie der US-Patentschrift US 5,500,367 beschrieben. In diesen Dokumenten wird die Isolierung von Stilbensynthase-Genen und ihre Verwendung zur Erzeugung von transgenen Pflanzen beschrieben. Die resultierenden transgenen Pflanzen weisen eine erhöhte Resistenz gegenüber verschiedenen Pflanzenschädlingen wie Pilzen,
5 Bakterien, Insekten, Viren und Nematoden auf. So wurde beispielsweise STS aus Weinrebe in Tabak und Reis exprimiert und führte dann zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Pathogenen (Hain et al. (1993), Nature 361, 153-156; Stark-Lorenzen et al. (1997), Plant Cell Rep. 16, 668-673). Da, wie vorstehend erwähnt, PSM Pflanzen vor verschiedenen Streßfaktoren wesentlich wirksamer schützt als PS, wäre die
10 Kenntnis der DNA-Sequenz, die für die die PSM-Synthese katalysierende PMT codiert, äußerst wünschenswert.

Es gibt inzwischen verschiedene Hinweise darauf, daß es für eine möglichst effiziente Krankheitsresistenz basierend auf der Expression von pflanzlichen
15 Abwehrgenen wie beispielsweise STS oder PMT in transgenen Pflanzen vorteilhaft ist, wenn die Expression des heterologen pflanzlichen Abwehrgens (bzw. der heterologen pflanzlichen Abwehrgene) in der Pflanze erst durch den Angriff der Pathogene, d.h. erst durch die Interaktion von Pflanze und Krankheitserreger, stimuliert wird (Fischer und Hain (1994), Current Opinion in Biotechnology 5, 125-
20 130; Fischer, Optimierung der heterologen Expression von Stilbensynthasegenen für den Pflanzenschutz, Dissertation Universität Hohenheim, 1994). Beispielsweise zeigten Untersuchungen mit transgenen Tabakpflanzen, in denen STS-Gene unter dem konstitutiven 35S RNA-Promotor von Cauliflower Mosaic Virus zur Expression gebracht wurden, daß die in diesen Pflanzen erzielte Krankheitsresistenz geringer ist
25 als in Pflanzen, die die gleichen Gene unter Kontrolle des Pathogen-induzierbaren homologen STS-Promoters nach Pilzbefall exprimierten (Fischer und Hain (1994) supra; Fischer (1994) supra.) Eine Induktion der Pathogenabwehr erfolgt bei dem letztgenannten System somit nur zum benötigten Zeitpunkt und nicht permanent.

- 4 -

- Es ist somit eine wichtige Aufgabe der vorliegenden Erfindung, DNA-Sequenzen bereitzustellen, die für PMT codieren. Insbesondere ist es eine wesentliche Aufgabe der vorliegenden Erfindung, einen durch Pathogene und/oder Ozon induzierbaren
- 5 PMT-Promotor bereitzustellen, um eine erhöhte Krankheitsresistenz in Pflanzen zu erzielen, in welche die PMT-Gene oder ein anderes pflanzliches Abwehrgen unter Kontrolle eines Pathogen- und/oder Ozon-induzierbaren Promotors eingeführt werden.
- 10 Ferner ist es eine wesentliche Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Herstellung transformierter Pflanzenzellen bzw. Pflanzen bereitzustellen, die eine erhöhte Pathogen- und/oder Ozon-induzierbare Krankheitsresistenz aufweisen. Weitere Aufgaben der Erfindung ergeben sich aus der folgenden Beschreibung und den beigefügten Patentansprüchen.
- 15 Zur Lösung dieser Aufgaben dienen die Merkmale der unabhängigen Schutzansprüche.
- Vorteilhafte Ausgestaltungen sind in den jeweiligen Unteransprüchen definiert.
- 20 Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül gelöst, das regulatorische Sequenzen eines in Pflanzenzellen aktiven Promotors, der eine durch Pathogene und/oder Ozon induzierbare Genexpression vermittelt, und operativ damit verknüpft eine DNA-Sequenz, die für ein Protein mit der
- 25 enzymatischen Aktivität einer Pinosylvin-3-O-methyltransferase (PMT) codiert, umfasst. Derartige rekombinante Nukleinsäuremoleküle führen nach der Einbringung in Pflanzenzellen zu einer Akkumulation von PSM in den transgenen Pflanzenzellen bzw. Pflanzen und damit zu einem wirksamen Schutz gegenüber Ozon und/oder

Pathogenen wie Pilzen. Da PSM eine wesentlich stärkere antimikrobielle Wirkung als PS aufweist, dessen Synthese durch das im Stand der Technik beschriebene STS-Genprodukt katalysiert wird, kann das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül mit überdurchschnittlichem Vorteil beispielsweise im modernen Pflanzenschutz
5 verwendet werden.

Die erfindungsgemäßen rekombinanten Nukleinsäuremoleküle umfassen funktionelle Fragmente der DNA. Unter "funktionell" sind Fragmente der PMT-Sequenz mit spezifischen Funktionen zu verstehen, wie beispielsweise Promotoren, Enhancer
10 sowie andere Steuersequenzen.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird der Promotor und/oder die DNA-Sequenz des erfindungsgemäßen rekombinanten Nukleinsäuremoleküls aus *Pinus sylvestris* (Kiefer) isoliert.
15

Insbesondere wird eine genomische DNA-Sequenz mit der Sequenz SEQ No. 1 aus *Pinus sylvestris* bereitgestellt, die für ein PMT-Protein codiert. Diese genomische Sequenz umfasst einschließlich Exon-, Intron- und flankierenden Sequenzen insgesamt 1908 Basenpaare. Das Gen, das für ein Protein mit der enzymatischen
20 Aktivität einer PMT codiert, besteht aus zwei kodierenden Exonregionen und einer Intronregion. Das Intron weist mit 102 Basenpaaren eine Größe auf, die für Introns üblich ist (Introns bestehen üblicherweise aus zwischen 70 und Tausenden von Nukleotiden; G.J. Goodall und W. Filipowicz (1991), EMBO J. 10, 2635-2644). Die 5'-Exon/Intron- und 3'-Intron/Exon-Grenzen bestätigen die bekannte GT/AG-
25 Donor/Akzeptor-Regel, die sowohl in Pflanzen als auch in Tieren gültig ist (J.W.S. Brown (1986), Nucl. Acids Res. 14, 9549-9559). Bei genauerer Betrachtung stimmt das AG/GTA-Motiv an der 5'-Exon/Intron-Spleißstelle mit der AG/GTAAG-Consensussequenz überein. Ferner enthält das Intron ein CAG/-Motiv an der 3'-

Intron/Exon-Spleißstelle analog der TGCAG/G-Consensus-Sequenz für Pflanzengene (Goodall und Filipowicz, supra). Das Intron ist AT-reich, was für den Spleißvorgang essentiell ist (Goodall und Filipowicz, supra). Die stromaufwärts gelegenen Sequenzen zeigten konservierte prokaryotische Elemente wie das cap-
5 Signal TCATTCGT an Position -18, ein als TATA-Box identifiziertes TGATAAAAGCA-Motiv an Position -46 und mutmaßliche CAAT-Boxen an den Positionen -80 und -210 (vgl. SEQ ID No. 1).

Bei einem wesentlichen Gegenstand der vorliegenden Erfindung wird ein Promotor
10 des PMT-Gens oder Fragmente davon bereitgestellt, die eine durch Pathogen- und/oder Ozon induzierbare Genexpression in Pflanzenzellen vermitteln. Ein derartiger induzierbarer Promotor weist gegenüber konstitutiven Promotoren den Vorteil auf, dass die Pathogenabwehr durch die Produkte der mit dem erfindungsgemäßen Promotor operativ verbundenen Gene bzw. kodierenden
15 Sequenzen (z.B. cDNA-Sequenzen) nur zum benötigten Zeitpunkt und nicht permanent erfolgt und somit eine höhere Krankheitsresistenz in Pflanzen, die dieses chimäre Genkonstrukt enthalten, erzielt werden kann. Vorzugsweise wird der erfindungsgemäße Promotor aus *Pinus sylvestris* isoliert.

20 Beispiele für Fragmente des erfindungsgemäßen Promotors des PMT-Gens aus *Pinus sylvestris* (Kiefer) sind W-Boxen im Bereich von -450 bis -420, -280 bis -240, -220 bis -180 sowie -100 bis -30, die insbesondere für die Pathogenabwehr wichtig sind (Rushton und Somssich (1998), Curr. Opinion Plant Biol. 1, 311-315), wie nachstehend ausführlich erläutert wird.

25 Der erfindungsgemäße PMT-Promotor aus der schottischen Kiefer enthält potentielle cis-Elemente. *Myb*-responsive Elemente (MRE) befinden sich an den Positionen -121, -129, -194, -230, -310 und -358. Das Element ACTTACCACCCT an Position -

- 358 stimmt in acht von zwölf Positionen mit der Consensus-Sequenz *T/A CT C/A ACCTA C/A C C/A* in mit UV-Licht und mit Pilzelicitoren induzierten Pflanzengen-Promotoren des Phenylpropanoid-Metabolismus überein (Lois et al. (1989), EMBO J. 8, 1641-1648). An den Positionen -121 und -230 stimmen die (A+C)-reichen
- 5 Motive CCAACCACCTCC und CCAACCACTC mit einem zweiten Consensusmotiv (*CCA A/C C A/T AAC C/T CC*) in zehn bzw. neun von zwölf Positionen überein (Lois et al., supra). Das Element GTTG an Position -194 ist die inverse Stelle des Kernmotivs CAAC. Ein weiteres Motiv an Position -129, TCCCATCTCC, stimmt in neun von zehn Positionen mit der Consensus-Sequenz
- 10 der boxE (*A/T CCC A/T T/A C A/T A/T G/C*) überein, die offensichtlich in Stress-induzierbaren Phenylpropanoidgen-Promotoren konserviert ist (B. Grimmig und U. Matern (1997), Plant Mol. Biol. 33, 323-341).

- In dem erfindungsgemäßen PMT-Promotor aus *Pinus sylvestris* befinden sich ferner
- 15 folgende regulatorische cis-wirkende Elemente, die für Flavonoid- und Stilben-biosynthesisierende Gene bekannt sind: G-Box-artige Motive (GTGG an den Positionen -147 und -165, CACC an Position -353; Faktor et al. (1996) Plant Mol. Biol. 32, 849-859), das H-Box-artige Motiv CCATCC in inverser Orientierung (GGTAGG an Position -140), die GC-Box GGGGCAGAAT (Consensus-Sequenz
- 20 *G/T GGGCGG G/A G/A C/T*) an Position -72; Elicitor-responsive Elemente, d.h. W-Boxen (ACTG an den Positionen -55, -199 und -263, und TGAC an Position -440 ; Rushton und Somssich, supra) und ein SV40-Enhancerkern in inverser Orientierung (TTACCAC an Position -356).

- 25 Die Charakterisierung des erfindungsgemäßen Promotors aus *Pinus sylvestris* ermöglicht die Bestimmung von potentiellen cis-regulatorischen Elementen, die möglicherweise in Beziehung mit der schnellen vorübergehenden Akkumulierung von PMT mRNA durch die Behandlung von Kiefern mit Ozon und Pilzelicitoren

stehen. PAL-, Cinnamat-4-hydroxylase und 4-Coumarat-CoA-ligase(4CL)-codierende Gene sind dafür bekannt, daß sie auf der Ebene der Transkription einer starken Kontrolle unterliegen und daß sie als Reaktion sowohl auf Entwicklungs- als auch auf Umgebungsstimuli in vielen Pflanzenspezies koordiniert exprimiert werden.

- 5 Die Mitglieder der *Myb*-Familie sind in die Regulierung dieser Phenylpropanoid-Gene involviert (Rushton und Somssich, supra).

- MREs befinden sich in dem erfindungsgemäßen PMT-Promotor aus *Pinus sylvestris* an den Positionen -121, -129, -194, -230, -310 und -358. Die MREs an den
- 10 Positionen -358, -310 und -230 wurden in Petersilie als Boxen L, A bzw. P für nahezu alle bekannten PAL- und 4 CL-Gene (Logemann et al. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 5905-5909) und ebenso für CCoAOMT-Gene in Petersilie (Grimmig und Mattern, supra) beschrieben. Diese Elemente alleine oder eine Promotorregion, die alle diese Elemente zusammen enthält, können jedoch keine
- 15 Elicitor- oder Licht-Responsivität eines Reportergenes in transienten Expressions-Assays vermitteln. Folglich sind diese Elemente offenbar notwendig, aber nicht ausreichend für eine Elicitor- oder Licht-vermittelte PAL- und 4CL-Genaktivierung (Logemann et al, supra). Ferner ist außer diesen Genen kein weiteres Beispiel eines in den allgemeinen Phenylpropanoid-Stoffwechsel involvierten Gens bekannt, dessen
- 20 Promotor einen vollständigen Satz aller dieser drei Boxen enthält, was deren funktionelle Wichtigkeit bei der koordinativen Regulierung dieser Gene weiter unterstreicht.

- Eine G-Box, die sich in der Nähe der TATA-Box befindet, ist ein weit verbreitetes
- 25 Sequenzmotiv in eukaryontischen Promotoren. Derartige G-Boxen liegen bei dem erfindungsgemäßen PMT-Promotor aus *Pinus sylvestris* an den Positionen -147 und -165 und in einer inversen Orientierung an der Position -353 vor. Die funktionelle Analyse von Pflanzenpromotoren hat gezeigt, dass die G-Box eine Rolle bei der

Promotoraktivierung durch verschiedene Signale wie Licht, Abscisinsäure und UV-Licht spielt (Faktor et al., supra).

- Die Konservierung der G-Box sowie der H-Box zwischen TATA- und G-Boxen in unterschiedlichen CHS-Promotoren unterstreicht ihre Wichtigkeit als regulatorische Motive (Faktor et al., supra). Eine H-Box liegt in dem erfindungsgemäßen Promotor der Kiefer in einer inversen Orientierung an der Position -140 zwischen der TATA- und den G-Boxen. Sowohl G- als auch H-Boxen wurden in dem Promotoren-nahen Bereich einer Anzahl von Genen gefunden, die für Phenylpropanoid-biosynthetisierende Enzyme codieren, wie beispielsweise PAL, 4CL und CHS (Zhu et al. (1996), *Current Opinion in Genetics & Development* 6, 624-630). Die G- und H-Box in der Nähe der TATA-Box wurden beide als essentiell für die florale Expression beschrieben (Faktor et al., supra).
- G-Boxen sind, ausgelöst durch Entwicklungssignale sowie durch pathogene Signale wie Abscisinsäure, Licht, UV-Bestrahlung und Verwundung, in die Regulation von diversen Genen involviert. Die H-Box ist nicht so weit verbreitet, wobei sie charakteristisch für Phenylpropanoid-biosynthetisierende Genpromotoren ist (Zhu et al, supra). Die G-Box und die H-Boxen sind zusammen notwendig und offensichtlich ausreichend für eine feed-forward-Stimulierung durch 4-Coumarinsäure (Loake et al (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 9230-9234). Die H-Box liegt ebenfalls in CHS- und PAL-Promotoren der Petersilie vor, und durch funktionelle Analyse wurde gezeigt, daß dieses cis-Element in die UV-Induktion involviert ist (Loake et al., supra).
- Enhancer- oder Aktivatorelemente erhöhen die transkriptionelle Aktivität von bestimmten eukaryontischen Genen dramatisch. Eine Kopie der SV40-Enhancer-Kernsequenz wird an Position -356 im PMT-Promotor gefunden. Derartige

Enhancer-Sequenzen wurden im Zusammenhang mit den Promotoren von PAL-Genen aus *Phaseolus vulgaris* (Cramer et al. (1989), Plant. Mol. Biol. 12, 367-383) und Petersilie-CCoAOMT (Grimmig und Mattern, supra) berichtet.

- 5 Elicitor-responsive Elemente (W-Boxen) TTGACC wurden von Raventos et al. (Plant J. 7, 147-155 (1995)) sowie von Rushton et al. (supra) beschrieben. Derartige W-Boxen finden sich bei dem erfindungsgemäßen PMT-Promotor aus *Pinus sylvestris* an Position -440 und in inverser Orientierung an den Positionen -55, -199 und -263. Sequenzen mit derartigen Elicitor-responsiven Elementen treten in
- 10 Promotoren von verschiedenen mit Abwehrgenen verwandten Genen einschließlich PR1 aus Petersilie (Rushton, Supra), im CHS-Promotor von Mais (Franken et al (1991) EMBO J. 10, 2605-2612) und im STS-Promotor von Wein auf (Schubert et al. (1997), Plant Mol. Biol. 34, 417-426; Ernst et al. (1999) "Ozone induced genes mechanisms and biotechnological applications" in Plant Responses to environmental
- 15 stress (Hrsgb.: M.S. Smallwood, C.M. Calvert, D.J. Bowles), BIOS Scientific Publishers, Oxford, 33-41). Elicitor-responsive Elemente sind allgemein verantwortlich für die Induktion von Pflanzenabwehrmechanismen.

- Im STS-Promotor aus Wein unterscheidet sich die Ozon-responsive Region (-430 bis
- 20 -280) von der Pathogen-responsiven Region (-280 bis -140) (Schubert et al., supra; Ernst et al., supra). In dem erfindungsgemäßen PMT-Promotor liegen die Pathogen- bzw. Elicitor-responsiven W-Boxen im größeren Umfang in dem Bereich zwischen -263 und -50 vor.

- 25 Bei einem weiteren wesentlichen Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die Erfindung chimäre Nukleinsäuremoleküle, in die der vorstehend genannte erfindungsgemäße Promotor oder Fragmente davon wie beispielsweise die vorstehend genannten W-Boxen eingeführt wurden. Vorzugsweise umfassen die

erfindungsgemäßen chimären Nukleinsäuremoleküle neben dem vorstehend genannten Promotor oder Fragmenten davon operativ mit dem Promotor verknüpfte DNA-Sequenzen, die für die Synthese von Phytoalexinen katalysierende Proteine codieren.

5

Phytoalexine im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind Verbindungen, die von Pflanzen aufgrund einer Ozon-Belastung oder aufgrund einer Infektion zur Abwehr der Pathogene, meist Pilze, gebildet werden können.

- 10 Somit können die in den erfindungsgemäßen chimären Nukleinsäuresequenzen enthaltenen codierenden Regionen durch Ozon und/oder Pathogene induzierbar in Pflanzen exprimiert werden. Besonders bevorzugt sind diese codierenden Regionen Abwehrgene, am meisten bevorzugt Gene für die Synthese von Phytoalexinen katalysierende Proteine, die natürlicherweise nicht Ozon- und/oder Pathogen-
15 induzierbar sind.

- Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle können beliebige Nukleinsäuremoleküle sein, insbesondere DNA- oder RNA-Moleküle, beispielsweise cDNA, genomische DNA, mRNA usw. Sie können natürlich vorkommende oder
20 durch gentechnische oder chemische Syntheseverfahren hergestellte Moleküle sein.

- Weiter betrifft die vorliegende Erfindung Vektoren, welche die vorstehend genannten rekombinanten Nukleinsäuremoleküle, Promotoren oder chimären Nukleinsäuremoleküle enthalten. Die vorliegende Erfindung umfasst somit auch
25 Vektoren, insbesondere Plasmide, Cosmide, Viren, Bakteriophagen und andere in der Gentechnik gängige Vektoren, die die vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle enthalten und ggf. für den Transfer der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle auf Pflanzen bzw. Pflanzenzellen eingesetzt werden können.

Ebenso betrifft die Erfindung transformierte Mikroorganismen, wie Bakterien, Viren, Pilze, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen enthalten.

- 5 Durch die Bereitstellung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle, Promotoren oder Vektoren besteht nun die Möglichkeit, pflanzliche Zellen mittels gentechnologischer Methoden dahingehend zu verändern, daß sie eine Ozon- und/oder Pathogen-induzierbare Merkmalsausprägung aufweisen. Insbesondere besteht nun die Möglichkeit pflanzliche Zellen mittels gentechnologischer Methoden
- 10 dahingehend zu verändern, daß sie ein oder mehrere pflanzliche Gene für die Synthese von Phytoalexinen katalysierende Proteine, deren Expression natürlicherweise nicht oder nicht wesentlich durch Ozon und/oder Pathogene induziert wird, durch Fusion des erfindungsgemäßen Promotors oder eines Fragments davon mit derartigen pflanzlichen Genen Pathogen- bzw. Ozon-
- 15 induzierbar ausprägen.

- Ebenso können pflanzliche Zellen mittels gentechnologischer Methoden dahingehend verändert werden, daß sie durch Einfügen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle oder mindestens eines Fragments davon in solche Pflanzen
- 20 bzw. Pflanzenzellen, die diese DNA-Sequenzen natürlicherweise nicht enthalten, eine Ozon- und/oder Pathogen-induzierbare Merkmalsausprägung aufweisen.

- Es ist ebenso eine Aufgabe der Erfindung, neue Pflanzen und Pflanzenzellen bereitzustellen, die sich durch eine Ozon- und/oder Pathogen-induzierbare
- 25 Expression von Genen auszeichnen, die entweder natürlicherweise nicht in diesen Pflanzen, bzw. Pflanzenzellen vorliegen oder die natürlicherweise nicht über den erfindungsgemäßen Promotor oder Fragmente davon verfügen.

- 13 -

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der erfindungsgemäßen für die PMT codierenden DNA-Sequenz sowie der Bereitstellung des für die Ozon- und/oder Pathogen-Induktion verantwortlichen Promotors oder Fragmenten davon, die eine durch Ozon und/oder Pathogene induzierbare Genexpression der durch sie

5 kontrollierten Abwehrgene in Pflanzen und pflanzlichen Zellen ermöglichen, gelöst.

Gegenstand der Erfindung sind somit transgene Pflanzen, die die erfindungsgemäßen rekombinanten Nukleinsäuremoleküle, Promotoren oder chimären Nukleinsäuremoleküle integriert in das pflanzliche Genom vorliegend enthalten. Bei

10 diesen Pflanzen kann es sich im Prinzip in jede beliebige Pflanze handeln. Vorzugsweise ist es eine monokotyle oder dikotyle Nutzpflanze. Beispiele für monokotyle Pflanzen sind Pflanzen, die zu den Gattungen Avena (Hafer), Triticum (Weizen), Secale (Roggen), Hordeum (Gerste), Oryza (Reis), Panicum, Pennisetum, Setaria, Sorghum (Hirse), Zea (Mais) und dergleichen gehören. Dikotyle

15 Nutzpflanzen umfassen unter anderem Baumwolle, Leguminosen wie Hülsenfrüchte und insbesondere Alfalfa, Sojabohne, Raps, Tomate, Zuckerrübe, Kartoffel, Zierpflanzen sowie Bäume. Weitere Nutzpflanzen können Obst (insbesondere Äpfel, Birnen, Kirschen, Weintrauben, Citrus, Ananas und Bananen), Ölpalmen, Tee-, Kakao- und Kaffeesträucher, Tabak, Sisal sowie bei Heilpflanzen Rauwolfia und

20 Digitales umfassen. Besonders bevorzugt sind die Getreide Weizen, Roggen, Hafer, Gerste, Reis, Mais und Hirse, Zuckerrübe, Raps, Soja, Tomate, Kartoffel und Tabak.

Gegenstand der Erfindung ist ferner Vermehrungsmaterial von erfindungsgemäßen Pflanzen, beispielsweise Samen, Früchte, Stecklinge, Knollen, Wurzelstücke usw.,

25 sowie Teile dieser Pflanzen wie Pflanzenzellen, Protoplasten und Kalli.

Die Pflanzenzellen umfassen differenzierte und undifferenzierte Pflanzenzellen einschließlich Protoplasten, in denen die erfindungsgemäßen rekombinanten

Nukleinsäuremoleküle, Promotoren oder chimären Nukleinsäuremoleküle integriert in das pflanzliche Genom oder als autonome Moleküle (einschließlich transiente Transformation) vorliegen.

- 5 Bei einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Wirtszellen, insbesondere prokaryontische und eukaryontische Zellen, die mit einem erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekül, einem erfindungsgemäßen Promotor oder einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert bzw. infiziert wurden, und Zellen, die von derartigen Wirtszellen abstammen und die beschriebenen Nukleinsäuremoleküle oder
- 10 Vektoren enthalten. Die Wirtszellen können Bakterien oder Pilzzellen sowie pflanzliche oder tierische Zellen sein.

- Der vorliegenden Erfindung liegt außerdem die Aufgabe zugrunde, Verfahren zur Herstellung von Pflanzen bzw. Pflanzenzellen aufzuzeigen, die eine erhöhte
- 15 Pathogen- und/oder Ozon- induzierbare Krankheitsresistenz aufweisen. Diese Aufgabe wird durch Verfahren gelöst, mit deren Hilfe die Erzeugung neuer Pflanzen bzw. Pflanzenzellen möglich ist, bei denen natürlicherweise keine pflanzlichen Abwehrgene gegen Ozon sowie Pathogene vorliegen bzw. die gewünschte Abwehrgenexpression nicht in ausreichendem Maß vorliegt und/oder die keine bzw.
- 20 keine ausreichende, natürlicherweise vorkommende Ozon- und/oder Pathogen-induzierbare Genexpression aufweisen.

- Zur Erzeugung solcher neuer Pflanzen bzw. Pflanzenzellen bieten sich verschiedene Methoden an. Zum einen können Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit Hilfe
- 25 herkömmlicher gentechnologischer Transformationsmethoden derart verändert werden, daß die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen bzw. Promotoren in das pflanzliche Genom integriert werden, so daß stabile Transformanten erzeugt werden.

Erfindungsgemäß werden Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit erhöhter Pathogen- und/oder Ozon-induzierbarer Krankheitsresistenz durch ein Verfahren hergestellt, bei dem ein oder mehrere Abwehrgene, vorzugsweise Gene, die für die Synthese von Phytoalexinen katalysierende Proteine codieren, in Form der erfindungsgemäßen rekombinanten Nukleinsäuremoleküle, die den erfindungsgemäßen Promotor und eine für PMT codierende Sequenz umfassen, oder in Form der erfindungsgemäßen chimären Nukleinsäuremoleküle, die den erfindungsgemäßen Promotor und ein oder mehrere Abwehrgene und vorzugsweise Gene umfassen, die für die Synthese von Phytoalexinen katalysierende Proteine codieren, eingeführt werden.

10

Alternativ werden Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit erhöhter Pathogen- und/oder Ozon-induzierbarer Krankheitsresistenz durch ein Verfahren hergestellt, bei dem ein oder mehrere Abwehrgene, bevorzugt Gene, die für die Synthese von Phytoalexinen katalysierende Proteine codieren, zwar natürlicherweise vorliegen, aber nicht durch Ozon und/oder Pathogene induzierbar sind, durch Einführung des erfindungsgemäßen Promotors oder von funktionellen Fragmenten davon induzierbar gemacht werden.

15

Bei der Einführung der erfindungsgemäßen rekombinanten Nukleinsäuremoleküle, umfassend den erfindungsgemäßen Promotor und eine für PMT codierende Sequenz, umfaßt das erfindungsgemäße Verfahren insbesondere folgende Schritte:

20

(a) soweit erforderlich das Einbringen der für eine Stilbensynthese codierenden DNA-Sequenz in eine Pflanzenzelle, falls in der Pflanzenzelle keine oder keine ausreichende STS-Genaktivität vorliegt (durch die Stilbensynthese wird Pinosylvin bereitgestellt, das als Substrat für die PMT dient, welche durch die DNA-Sequenz der erfindungsgemäßen rekombinanten Nukleinsäuremoleküle codiert wird),

25

- 16 -

- (b) das Einbringen des erfindungsgemäßen rekombinanten Nukleinsäuremoleküls in die Pflanzenzelle, und ggf.
- 5 (c) das Regenerieren vollständig transformierter Pflanzen aus den transformierten Pflanzenzellen, und ggf.
- (d) das Gewinnen der gewünschten Pflanzenteile einschließlich der Samen der so erhaltenden Pflanzen.

10

Bevorzugt wird das rekombinante PMT-Enzym in einer solchen Menge exprimiert, daß durch die Methylierung von Pinosylvin ein zumindest teilweiser Schutz gegenüber Ozon und/oder durch pathogene Organismen verursachte Erkrankungen der Pflanzen bewirkt wird. Es kann ausreichend sein, daß lediglich die funktionellen

15 Teile des rekombinanten Proteins exprimiert werden, um einen derartigen Schutz zu bewirken.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das rekombinante Protein oder ein funktioneller Teil davon zur Methylierung von Pinosylvin oder einem

20 Derivat von Pinosylvin benutzt, wobei sich dieser Anwendungszweck auch auf pharmazeutische Einsatzgebiete oder sonstige Gebiete erstrecken kann, bei denen eine Methylierung von Pinosylvin von hoher Spezifität erforderlich ist.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht darin, vorteilhafte Verwendungen der

25 erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle oder der erfindungsgemäßen Promotoren aufzuzeigen.

- 17 -

Die Erfindung umfaßt daher Verwendungen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle bzw. der erfindungsgemäßen Promotoren zur Erzeugung der vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Pflanzen und Pflanzenzellen, die sich aufgrund der Anwesenheit der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle durch eine

5 Ozon- und/oder Pathogen-induzierte Merkmalsausprägung von nicht-transgenen Pflanzen und Pflanzenzellen unterscheiden.

Des weiteren umfaßt die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle bzw. der erfindungsgemäßen Promotoren oder von

10 Fragmenten davon zur Auffindung und Identifizierung von Ozon- und/oder Pathogen-responsiven Nukleinsäureelementen in pflanzlichen Genen.

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls Nukleinsäuremoleküle oder Fragmente davon, die mit einer der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen hybridisieren. Der

15 Begriff "Hybridisierung" bedeutet im Rahmen dieser Erfindung eine Hybridisierung unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, beschrieben sind.

20 Nukleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Molekülen hybridisieren, können beispielsweise aus genomischen oder aus cDNA-Bibliotheken isoliert werden.

25 Die Identifizierung und Isolierung derartiger Nukleinsäuremoleküle kann dabei unter Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle oder Teilen dieser Moleküle bzw. der reversen Komplemente dieser Moleküle erfolgen, beispielsweise

mittels Hybridisierung nach Standardverfahren (siehe beispielsweise Sambrook et al, supra).

Somit betrifft die Erfindung ebenfalls die Verwendung einer erfindungsgemäßen

- 5 DNA-Sequenz oder von Teilen davon zur Identifizierung und Isolierung homologer Sequenzen aus Pflanzen oder anderen Organismen.

Als Hybridisierungssonde können beispielsweise Nukleinsäuremoleküle verwendet werden, die exakt oder im wesentlichen die erfindungsgemäßen

- 10 Nukleinsäuremoleküle oder Teile dieser Sequenzen aufweisen. Bei den als Hybridisierungssonde verwendeten Fragmenten kann es sich auch um synthetische Fragmente handeln, die mit Hilfe der gängigen Synthesetechniken hergestellt wurden und deren Sequenz im wesentlichen mit der eines erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls übereinstimmt. Hat man Gene identifiziert und isoliert, die
- 15 mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen hybridisieren, ist eine Bestimmung der Sequenz und eine Analyse der Eigenschaften erforderlich. Hierzu stehen dem Fachmann eine Reihe von molekularbiologischen, biochemischen und biotechnologischen Standardverfahren zur Verfügung.

- 20 Die mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen hybridisierenden Moleküle umfassen auch Fragmente, Derivate und allelische Varianten der vorstehend beschriebenen DNA-Sequenzen, die eine Ozon- und/oder Pathogen-responsive Sequenz, in aktiver oder inaktiver Form, enthalten. Der Ausdruck "Derivat" bedeutet in diesem Zusammenhang, daß die Sequenzen dieser Moleküle sich von den
- 25 Sequenzen der vorstehend beschriebenen Nukleinsäuremoleküle an einer oder mehrerer Positionen unterscheiden und einen hohen Grad an Homologie zu diesen Sequenzen aufweisen. Homologie bedeutet dabei eine Sequenzidentität von mindestens 40%, insbesondere eine Identität von mindestens 60%, vorzugsweise

über 80% und besonders bevorzugt über 90%. Die Abweichungen zu den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuremolekülen können dabei durch Deletion, Addition, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein.

- 5 Bei den Nukleinsäuremolekülen, die homolog zu den vorstehend beschriebenen Molekülen sind und Derivate dieser Moleküle darstellen, handelt es sich in der Regel um Variationen dieser Moleküle, die Modifikationen darstellen, die diesselbe biologische Funktion ausüben. Es kann sich dabei sowohl um natürlicherweise auftretende Variationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus anderen
- 10 Organismen, oder um Mutationen, wobei diese Modifikationen auf natürliche Weise aufgetreten sein können oder durch gezielte Mutagenese eingeführt wurden. Ferner kann es sich bei den Variationen um synthetisch hergestellte Sequenzen handeln. Bei den allelischen Varianten kann es sich sowohl um natürlich auftretende als auch um synthetisch hergestellte oder durch rekombinante DNA-Techniken erzeugte
- 15 Varianten handeln.

- Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen bzw. deren Zellen stehen eine große Anzahl von Klonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für *E. coli* und ein Markergen zur Selektion transformierter
- 20 Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw. Die gewünschte Sequenz kann an einer passenden Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltende Plasmid wird für die Transformation von *E. coli*-Zellen verwendet. Transformierte *E. coli*-Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet und anschließend
- 25 geerntet und lysiert. Das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analysemethoden zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen Restriktionsanalysen, Gelelektrophoresen und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden eingesetzt. Nach jeder Manipulation können die

Plasmid-DNA gespalten und gewonnene DNA-Fragmente mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden. Jede Plasmid-DNA-Sequenz kann in den gleichen oder anderen Plasmiden kloniert werden.

- 5 Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl bekannter Techniken zur Verfügung, wobei der Fachmann die jeweils geeignete Methode ohne Schwierigkeiten ermitteln kann. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als
- 10 Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, den direkten Gentransfer isolierter DNA in Protoplasten, die Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten. Dabei können sowohl stabile als auch transiente Transformanten erzeugt werden.
- 15 Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden per se keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Ähnliches gilt für den direkten Gentransfer. Es können einfache Plasmide wie beispielsweise pUC-Derivate verwendet werden. Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens
- 20 notwendig. Dem Fachmann sind die gängigen Selektionsmarker bekannt und es stellt für ihn kein Problem dar, einen geeigneten Marker auszuwählen. Gebräuchliche Selektionsmarker sind solche, die den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid oder einem Antibiotikum wie Kanamycin, G418, Bleomycin, Hygromycin, Methotrexat, Glyphosat, Streptomycin, Sulfonyl-Harnstoff,
- 25 Gentamycin oder Phosphinotricin und dergleichen vermitteln.

Je nach Einführungsmethode gewünschter Gene in die Pflanzenzelle können weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden beispielsweise für die Transformation der

Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muß mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der im Ti- und Ri-Plasmid enthaltenen T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden.

5

Werden für die Transformationen Agrobakterien verwendet, muß die einzuführende DNA in spezielle Plasmide kloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären oder in einem binären Vektor. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch
10 homologe Rekombination in das Ti- oder Ri- Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige vir-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf *Agrobacterium tumefaciens* übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in *E. coli* als auch
15 in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen Linker oder Polylinker, welche von der rechten und linken T-DNA-Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (Holsters et al. (1978), Molecular and General Genetics 163, 181-187). Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium soll ein Plasmid, das eine vir-Region trägt,
20 enthalten. Die vir-Region ist für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle notwendig. Zusätzlich T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet.

Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv
25 untersucht und ausreichend in EP 120 515 beschrieben worden.

Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes*

- kultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (beispielsweise Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeignetem Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze
- 5 Pflanzen regeneriert werden. Die Regeneration der Pflanzen erfolgt nach üblichen Regenerationsmethoden unter Verwendung bekannter Nährmedien. Die so erhaltenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA untersucht werden.
- 10 Andere Möglichkeiten der Einführung fremder DNA unter Verwendung des biolistischen Verfahrens oder durch Protoplasten-Transformation sind dem Fachmann bekannt (vgl. L. Willmitzer (1993) Transgenic Plants in: Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise (Herausgeber: H.J. Rehm et al.), Band 2, 627-659, VCH Weinheim, Deutschland).
- 15 Während die Transformation dikotyler Pflanzen bzw. derer Zellen über Ti-Plasmid-Vektorsysteme mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* wohl etabliert ist, weisen neuere Arbeiten darauf hin, daß auch monokotyle Pflanzen bzw. deren Zellen der Transformation mittels auf Agrobakterien basierender Vektoren sehr wohl
- 20 zugänglich sind (siehe u.a. Chan et al. (1993), Plant Mol. Biol. 22, 491-506).
- Alternative Systeme zur Transformation von monokotylen Pflanzen bzw. deren Zellen sind die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes (Wan und Lemaux (1994) Plant Physiol. 104, 37-48; Vasil et al. (1993) Bio/Technology 11, 1553-1558;
- 25 Ritala et al. (1994) Plant Mol. Biol. 24, 317-325; Spencer et al. (1990), Theor. Appl. Genet. 79, 625-631), die Protoplasten-Transformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen sowie die Einbringung von DNA mittels Glasfasern.

- 23 -

Die transformierten Zellen wachsen innerhalb der Pflanze in der üblichen Weise (siehe auch McCormick et al. (1986), Plant Cell Reports 5, 81-84). Die resultierenden Pflanzen können normal angezogen werden und mit Pflanzen, die die gleiche transformierte Erbanlage oder andere Erbanlagen besitzen, gekreuzt werden.

- 5 Die daraus entstehenden hybriden Individuen besitzen die entsprechenden phänotypischen Eigenschaften.

- Es sollten zwei oder mehrere Generationen angezogen werden, um sicherzustellen, daß das phänotypische Merkmal stabil beibehalten und vererbt wird. Auch sollten
10 Samen geerntet werden, um sicherzustellen, daß der entsprechende Phänotyp oder andere Eigenarten erhalten geblieben sind.

- Ebenso können nach üblichen Methoden transgene Linien bestimmt werden, die für die neuen Nukleinsäuremoleküle homozygot sind und ihr phänotypisches Verhalten
15 hinsichtlich einer vorhandenen bzw. nicht vorhandenen Ozon- und/oder Pathogen-Responsivität untersucht und mit dem von hemizygoten Linien verglichen werden.

- Selbstverständlich können Pflanzenzellen, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle enthalten, auch als Pflanzenzellen (einschließlich
20 Protoplasten, Kalli, Suspensionskulturen und dergleichen) weiterkultiviert werden.

- Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle oder Teile dieser Moleküle bzw. der reversen Komplemente dieser Moleküle zur Identifizierung und Isolierung
25 homologer Moleküle, die Ozon- und/Pathogen-responsive Elemente umfassen, aus Pflanzen oder anderen Organismen. Die Definition des Begriffes "Homologie" ist vorstehend angegeben.

Die nachfolgenden Beispiele dienen der Erläuterung der vorliegenden Erfindung, ohne diese in irgendeiner Weise einzuschränken.

Beispiele:

5 Beispiel 1: Pflanzen- und Pilzmaterial

Sieben Jahre alte Kiefernsetzlinge wurden von der Baumschule Bauchery, Crouy-sur-Cosson, Loir et Cher, Frankreich bezogen und für weitere fünf Monate in einem Gewächshaus gezüchtet. Nach den experimentellen Behandlungen wurden die
10 Bäume zurück in das Gewächshaus gebracht, und nach einem Jahr wurde deren Überlebensrate bestimmt. Der Pilz *Leptographium wingfieldii* stammt aus der INRA-Sammlung (Orléans, Frankreich) und wurde ursprünglich aus dem Borkenkäfer *Tomicus piniperda* isoliert. Er wurde durch eine Monosporenkultur weiter gereinigt und im Dunkeln bei 22°C auf Malz-Agar gezüchtet (Lieutier et. al. (1989), Ann. Sci.
15 For. 46, 201-216). Die Kulturen wurden bei 4 °C mit einem jährlichen Durchlauf auf Baumstämmen der schottischen Kiefer bei 22 °C aufbewahrt, um ihre Aktivität aufrecht zu erhalten.

20 Beispiel 2: Ozonbehandlung

Die Setzlinge wurden sechs Tage lang in Klimakammern akklimatisiert (Thiel et al. (1996), J. Plant Physiol. 148, 456-463). Die Lichtdauer betrug 14 Stunden pro Tag (PAR: 1300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$; UV-A: 22,5 Wm^{-2} ; UV-B: 0,45 MEDh^{-1}); die Tages-/
25 Nachttemperaturen betrugen 22 °C bzw. 16 °C und die relativen Feuchtigkeiten bei Tag bzw. bei Nacht betrugen 70% bzw. 85%. Die Setzlinge wurden mit Ozon (0,15 oder 0,3 $\mu\text{l l}^{-1}$) zehn Stunden täglich für eine Dauer von zwei Tagen behandelt.

- 25 -

In allen RT-PCR-Experimenten wurden ausschließlich einzelne Banden bei 1,15 kb für *PMT*, 1,17 kb für *STS* und 0,8 kb für *cab* detektiert. Mit *cab*-Primern durchgeführt RT-PCR Kontrollexperimente zeigten ein gleichbleibendes Niveau an *cab*-Transkripten in nicht Ozon-behandelten Geweben und eine Abnahme dieser
5 Transkripte in Geweben, die 0,15 bzw. 0,3 $\mu\text{l l}^{-1}$ Ozon ausgesetzt waren.

In Kontrollbäumen, die ozonfreier Luft ausgesetzt waren, waren *STS*- oder *PMT*-Transcripte in den Nadeln und dem Phloem fast nicht detektierbar. Zwei zehnstündige Perioden Ozonbegasung waren ausreichend, um die *STS*-und *PMT*-
10 Transkript-Niveaus in Nadeln von Bäumen der schottischen Kiefer dramatisch zu erhöhen. Die Begasung mit 0,15 $\mu\text{l l}^{-1}$ Ozon resultierte in einem ersten Peak der *STS*-Transkripte nach sechs Stunden Aussetzung, gefolgt von einem weiteren Anstieg 48 Stunden nach dem Beginn der Behandlung, während die *PMT*-Transcripte zunächst bis 24 Stunden nach dem Beginn der Begasung auf dem Kontrollniveau blieben und
15 erst dann begannen, sich zu akkumulieren. Die Aussetzung an 0,3 $\mu\text{l l}^{-1}$ Ozon führte zu einem weiteren Anstieg der beiden Transkriptniveaus und blieb in den Nadeln auf einem hohen Niveau. Im Gegensatz dazu wurden die Mengen an *STS*- und *PMT*-mRNA im Phloem nicht wesentlich durch Ozon beeinflusst.

20

Beispiel 3: Beimpfungen

48 Stunden nach dem Beginn der Ozonbegasung wurden zwei sterile Beimpfungen und zwei Pilzbeimpfungen bei jedem Baum in jedem Raum durchgeführt. Gemäß der
25 von Wright beschriebenen Methode (Phytopathol. 23, 487-588 (1933)) wurden kalibrierte Agar-Disks (Durchmesser 3 mm) einer drei Wochen alten, sporulierenden *Leptographium wingfieldii*-Kultur in Höhe des Kambiums in den Baum eingeführt. Scheinbeimpfungen ohne Pilz wurden mit sterilen Malz-Agar-Disks (Durchmesser 3

mm) durchgeführt. Die Beimpfungen wurden an zwei unterschiedlichen Höhen des Stammes mit einem Abstand von mindestens 20 cm durchgeführt. Ein 4 cm (horizontal) x 7 cm (vertikal) großes Rechteck um die jeweilige Infektionsstelle des Phloem-Gewebes wurde entfernt und für die RNA-Analyse verwendet, nachdem ein
5 1 cm x 2 cm großes Rechteck des Phloem-Gewebes, das direkt um den Infektionspunkt lag, entfernt wurde.

Die Scheinbeimpfung führte zu einer Akkumulierung beider Transkripte am Tag 5 (drei Tage nach der Beimpfung). Die *STS* mRNA zeigte eine progressive Anhäufung
10 bis zum Tag 9 (120 ng ng⁻¹ cDNA), nahm dann langsam ab und war nach 16 Tagen immer noch auf einem hohen Niveau. Die *PMT*-mRNA nahm progressiv nach Tag 5 (50 ng ng⁻¹ cDNA) ab, um am Ende des Experiments wieder auf dem Kontrollniveau zu sein.

15 Die zwei Kinetiken als Reaktion auf die Scheinbeimpfung wurde durch eine vorangehende Ozonbegasung stark beeinflusst. 0,15 µl l⁻¹ Ozon führten zu einer dramatischen Abnahme des *STS* mRNA-Reaktionsmusters. Die *PMT* mRNA-Reaktionskurve wurde ebenfalls erniedrigt. Eine Vorbehandlung mit 0,3 µl l⁻¹ Ozon führte zu einem Peak an *STS*-Transkripten am selben 9. Tag wie bei der
20 Scheinbeimpfung alleine, verlängerte jedoch die Akkumulierung bis zum 16. Tag. Die *PMT*-Transcripte zeigten eine progressive Anhäufung bis zum Tag 16 (75 ng ng⁻¹ cDNA).

Die Pilzbeimpfung führte zu vorübergehenden Peaks an *STS*- und *PMT*-Transkripten
25 nach 5 (200 ng ng⁻¹ cDNA) bzw. 9 (130 ng ng⁻¹ cDNA) Tagen nach Beginn des Experiments. Durch die Ozonbegasung mit 0,15 µl l⁻¹ nahm der Peak der *STS*-Transkript-Akkumulierung leicht ab und verzögerte den Peak an *PMT*-Transcripten bis Tag 16 (110 ng ng⁻¹ cDNA). Die Ozonbegasung mit 0,3 µl l⁻¹ verlängerte den

Peak von *STS* auf ein stabiles Niveau von $150 \text{ ng ng}^{-1} \text{ cDNA}$, während die Menge an *PMT*-Transkripten bis 16 Tage nach Beginn des Experiments auf $170 \text{ ng ng}^{-1} \text{ cDNA}$ anstieg. Durch die Pilze wurde der Peak an *STS*- und *PMT*-Transkriptmengen, der während der Beimpfung auftrat, etwa verdoppelt, wobei er für *STS* vier Tage früher auftrat. Die *STS*- und *PMT*-Transkriptmengen zeigten ähnliche Reaktionen auf Ozon. Bei $0,15 \mu\text{l l}^{-1}$ trat eine wesentliche Abnahme auf, während bei $0,3 \mu\text{l l}^{-1}$ die Peakhöhe verlängert wurde oder geringfügig zunahm.

Die dosisabhängige Anhäufung nach Ozoninduktion von *STS*- und *PMT*-Transkripten in Nadeln stimmt gut mit früher gefundenen Anstiegen von Stilbengehalten, *STS*- und *PMT*-Enzymaktivitäten und *STS*-Transkripten in Setzlingen der schottischen Kiefer überein (Rosemann et al, supra; Zinser et al. (1998), Planta 204, 169-176). Der Vergleich dieser Daten liegt nahe, das die Stilbenmetaboliten auf der Ebene der Transkription reguliert werden.

Ozon induziert keine *STS*- und *PMT*-mRNA in Phloem, was andeutet, daß kein systematischer Ozoneffekt vorliegt.

Verwundungen führten zu vorübergehenden Induktionen der *SDS*- und *PMT*-Transcripte, die durch Pilze während der ersten Woche nach der Impfung anstiegen. Die Stilbene PS und PSM wurden im Reaktionsbereich nur in Phloem dedektiert, das verwundet bzw. durch einen mit dem Borkenkäfer verwandten Pilz beimpft wurde, was mit der vorgeschlagenen Stilbeninvolvierung in die Baumresistenz übereinstimmt (Lieutier et al. supra; Bois und Lieutier (1997), Plant Physiol. Biochem. 35, 819-825). Die Ozonbehandlung führt zu einem vorübergehenden Anstieg an *STS*- und *PMT*-mRNA in den Nadeln, was eine Ähnlichkeit zwischen dem ozon- und pathogen-induzierten Anstieg an Transkripten aufzeigt.

Beispiel 4: Gesamt-RNA-Extraktion

Lyophilisierte Nadeln (70 bis 90 mg) unter Verwerfung der aktuellen Jahresblüte
5 sowie lyophilisiertes Phloem-Gewebe (100 mg) wurden zu einem feinen Pulver
gemahlen, und die Gesamt-RNA wurde auf herkömmliche Weise isoliert.

Beispiel 5: Extraktion der genomischen DNA

Die genomische DNA wurde aus den Nadeln von ausgewachsenen schottischen Kiefern gemäß des Protokolls 1 in Csaikl et. al (Plant Mol. Biol. Rep. 16, 69-86
5 (1998)) extrahiert.

Beispiel 6: Isolierung des genomischen PMT-Klons

10 Die Promotor-Sequenz wurde erhalten, in dem genspezifische reverse Primer aus der PMT cDNA-Sequenz (Deutsche Patentanmeldung DE-A-198 36 774; Ernst et al. (1999) Forest Biotechnology, University of Oxford, 11.-16. Juli 1999; Ernst et al. (1999) IUFRO Conference, University of Munich, 12.-17. Sept. 1999) gemäß dem durch Cormack und Somssich beschriebenen Verfahrens (Gene 194, 273 bis 276
15 (1997)) entwickelt wurden. 1,5 µg der genomischen DNA der schottischen Kiefer wurden mit 20 Einheiten *Eco*RI vollständig verdaut. Die DNA wurde fünf Minuten lang auf Eis mit 2 Volumeneinheiten Isopropanol ausgefällt, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in 15 µl H₂O wieder suspendiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei 90°C wurde die DNA bei 37°C mit 0,5 mM dATP und 1,5 mM CoCl₂
20 in Puffer 1,5 Stunden lang polyadenyliert. Als Puffer diente dabei 20 µl terminaler Transferase (TdT)-Puffer (Roche) mit 50 Einheiten TdT. Die Reaktion wurde durch fünfminütige Erwärmung der Probe bei 72 °C beendet.

Die erste Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde mit einem Zehntel des Volumens
25 der polyadenylierten DNA (150 ng), 100 pmol des Gen-spezifischen Primers 1 (5'-TCCCCGAGTTCCATGCCAGAA-3'), 100 pmol des universal-T17-Primers (5'-GTAAAACGACGGCCAGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'), 200 µM dNTPs und 5 Einheiten *AGS-GoldTM* DNA-Polymerase (AGS) in 100 µl 1 x *AGSGoldTM*-

- 30 -

Puffer durchgeführt, wobei die Wärmezyklus-Bedingungen einen anfänglichen Denaturierungsschritt bei 94 °C für 1 Minute, gefolgt von 35 Zyklen von 1 Minute Denaturierung bei 94 °C, Primer-Anheftung bei 60 °C für 1 Minute, und 3 Minuten Verlängerung bei 72 °C mit einem abschließenden zehnminütigen

- 5 Verlängerungsschritt bei 72 °C umfaßten.

Die zweite PCR wurde unter Verwendung von 1 µl des ersten PCR-Produkts unter denselben Bedingungen wie bei der ersten PCR durchgeführt, außer daß 100 pmol des Gen-spezifischen Primers 2 (5'-GCCGATCCCATTTCGAATCC-3') und 100
10 pmol des Universal-Primers (5'- GTAAAACGACGGCCAGT-3') verwendet wurden. Das PCR-Endprodukt wurde gereinigt und in den pGEM-T-Vektor (Promega) entsprechend den Anweisungen des Herstellers kloniert . Die Plasmide wurden kommerziell sequenziert (MWG).

15 Beispiel 7: RT-PCR-Analyse

Die Gesamt-RNA (5 µg) aus Kiefernadeln oder Phloem-Gewebe wurden mit DNaseI verdaut und durch 200 Einheiten Superscript II RT (Life Technologies) 1 Stunde lang bei 42 °C revers transkribiert, wobei ein entsprechender Puffer, 10 mM
20 DTT, 0,4 mM eines jeden dNTP's, 100 nM oligo-dT₁₂₋₁₈-Primer (Life Technologies) und 10 Einheiten RNase-Inhibitor (Lfve Technologies) zugegeben wurden.

Die cDNA wurde gemäß des von Kiefer et. al. (supra) beschriebenen Verfahrens quantifiziert, und 10 ng wurden für die PCR mit 2,5 Einheiten *Taq*-Polymerase
25 (Amersham Pharmacia Biotech), einem entsprechenden Puffer, 0,2 mM eines jeden dNTP's und 0,2 µ 3'-und 5'-Primern verwendet. Die Amplifizierung wurde während 35 Zyklen von 1 Minute Denaturierung bei 94 °C, 1 Minute Primer-Anheftung bei 58 °C (*PMT*-und *cab*-Primer) oder 62 °C (*STS*-Primer) und 2 Minuten Verlängerung bei

- 31 -

72 °C durchgeführt. Die Reaktionsprodukte wurden durch Elektrophorese mittels eines 1%igen Agarosegels analysiert, und unter UV-Licht nach Ethidiumbromid-Anfärbung sichtbar gemacht und unter Verwendung des Picogreen-Verfahrens (Molecure Probes) quantifiziert. Die Echtheit der PCR-Produkte wurde durch zwei
5 gerichtete partielle Sequenzierungen unter Verwendung der Thermo Sequenase-Kits (Amersham Pharmacia Biotech) überprüft.

Abbildungen:

10

Abbildung 1 (= SEQ ID No. 1)

Nukleotidsequenz des PMT-Gens aus *Pinus sylvestris* und die davon abgeleitete Proteinsequenz: Die vorhergesagte Transkriptionsstartsstelle wird als +1 bezeichnet. Konservierte eukaryotische Promotorelemente (CAP-Signal, TATA-, CATA-
15 ,CAAT- und GC-Boxen) und potentielle pflanzenregulatorische Elemente (G- und H-Boxen) sind unterstrichen, und Myb-responsive Elemente (MREs) sind übergelegt. Elicitor-regulatorische Elemente (W-Boxen) sind fett gedruckt und der SV40-Enhancer ist kursiv gedruckt.

20

P A T E N T A N S P R Ü C H E

1. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül, umfassend
 - 5 a) regulatorische Sequenzen eines in Pflanzen aktiven Promotors, der eine durch Pathogene und/oder Ozon induzierbare Genexpression vermittelt; und
 - b) operativ damit verknüpft eine DNA-Sequenz, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Pinosylvin-3-O-methyltransferase (PMT) kodiert.
- 10 2. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, wobei der Promotor und/oder die DNA-Sequenz aus der Kiefer (*Pinus sylvestris*) isoliert ist.
3. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül, umfassend die in Sequenz SEQ ID No. 1 angegebene Promotorsequenz oder Fragmente davon, die eine Pathogen- und/oder
 - 15 Ozon-responsive Expression einer damit operativ verbundenen kodierenden Region vermitteln.
4. Isolierter Promotor eines Pinosylvin-3-O-methyltransferase (PMT)-Gens oder Fragmente davon, die eine Pathogen- und/oder Ozon induzierbare Genexpression in
 - 20 Pflanzenzellen vermitteln.
5. Promotor nach Anspruch 4, isoliert aus Kiefer (*Pinus sylvestris*).
6. Promotor wie in SEQ ID No. 1 angegeben.
- 25 7. Chimäres Nukleinsäuremolekül, umfassend den Promotor nach einem der Ansprüche 4 bis 6 oder Fragmente davon.

- 33 -

8. Chimäres Nukleinsäuremoleküle nach Anspruch 7, das mindestens eine operativ mit dem Promotor verknüpfte DNA-Sequenz umfasst, die für ein Abwehrgen, insbesondere für ein die Synthese von Phytoalexinen katalysierendes Protein codiert.

5

9. Chimäres Nukleinsäuremoleküle nach Anspruch 8, wobei die DNA-Sequenz für ein Protein kodiert, das natürlicherweise nicht Pathogen- und/oder Ozon-induzierbar ist.

10 10. Vektoren, welche einen Promotor oder ein Nukleinsäuremolekül nach einem der vorangehenden Ansprüche enthalten.

11. Transgene Pflanzen, welche einen Promotor, ein Nukleinsäuremolekül oder einen Vektor nach einem der vorangehenden Ansprüche enthalten, sowie Teile dieser
15 Pflanzen und deren Vermehrungsmaterial, wie Protoplasten, Pflanzenzellen, Kalli, Samen, Knollen oder Stecklinge usw., sowie die Nachkommen dieser Pflanzen.

12. Dikotyle Pflanzen nach Anspruch 11, insbesondere Nutzpflanzen, wie Sojabohne, Raps, Tomate, Zuckerrübe, Kartoffel, Baumwolle, Tabak sowie
20 Zierpflanzen oder Bäume.

13. Monokotyle Pflanzen nach Anspruch 11, insbesondere Getreide wie Hafer, Weizen, Roggen, Gerste, Reis, Hirse oder Mais.

25 14. Transgene Pflanzenzellen, einschließlich Protoplasten, welche einen Promotor, ein Nukleinsäuremolekül oder einen Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 10 enthalten.

- 34 -

15. Pflanzenzellen nach Anspruch 14, in denen aufgrund der Einführung des Nukleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 3, eines Promotors nach einem der Ansprüche 4 bis 6 oder eines chimären Nukleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 7 bis 10 oder mindestens eines Fragments davon eine Ozon- und/oder
- 5 Pathogen-induzierbare Expression eines natürlicherweise nicht über die entsprechende DNA-Sequenz verfügenden Gens erfolgen kann.
16. Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzenzellen bzw. transgener Pflanzen mit erhöhter Pathogen- und/oder Ozon-induzierbarer Krankheitsresistenz,
- 10 bei dem ein Abwehrgen, insbesondere ein Gen für ein die Synthese von Phytoalexinen katalysierendes Protein, in Form der Nukleinsäuremoleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder in Form der Nukleinsäuremoleküle nach Anspruch 8 oder 9 eingeführt wird.
- 15 17. Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzenzellen bzw. transgener Pflanzen mit erhöhter Pathogen- und/oder Ozon-induzierbarer Krankheitsresistenz, bei dem ein Abwehrgen, insbesondere ein Gen für ein die Synthese von Phytoalexinen katalysierendes Protein, unter Kontrolle eines Promotors nach einem der Ansprüche 4 bis 6 oder von Fragmenten davon, die eine durch Ozon und/oder
- 20 Pathogene induzierbare Expression vermitteln, steht.
18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, wobei das durch das Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3 kodierte Protein in einer solchen Menge exprimiert wird, daß durch die Methylierung von Pinosylvin ein
- 25 zumindest teilweiser Schutz gegenüber durch pathogene Organismen und/oder Ozon verursachte Erkrankungen der Pflanzen bewirkt wird.

19. Verfahren zur Erzeugung von Ozon- und/oder Pathogen-induzierbarer Merkmalsausprägung in transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen durch Übertragen des Nukleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 3, eines Promotors nach einem der Ansprüche 4 bis 6 oder eines chimären Nukleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 7 bis 9 oder mindestens eines Fragments davon auf Pflanzen bzw. Pflanzenzellen.
20. Verwendung des Nukleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder 7 bis 10 oder eines Fragments davon zur Erzeugung erhöhter Pathogen- und/oder Ozon-induzierbarer Krankheitsresistenz in transgenen Pflanzen.
21. Verwendung des Promotors nach einem der Ansprüche 4 bis 6 oder eines Fragments davon zur Erzeugung von Ozon- und/oder Pathogen-induzierbarer Merkmalsausprägung in transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen.
22. Verwendung des Promotors nach einem der Ansprüche 4 bis 6 oder eines Fragments davon zur Expression heterologer pflanzlicher Abwehrgene.
23. Verwendung des Nukleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder 7 bis 10 oder eines Fragments davon und/oder des Promotors nach einem der Ansprüche 4 bis 6 oder eines Fragments davon zur Auffindung und Identifizierung von Ozon- und/oder Pathogen-responsiven Nukleinsäureelementen in pflanzlichen Genen.

- 615							CATTT CTCCCTAAAT	- 601
- 600	CTATTAGGTA	CTTTGGGGTT	TTTGATAGTG	CTGAATCTAT	TTCTGCTGTG	CGGAATCTAT		- 541
- 540	AATCTATTAG	ATACTTTGGG	ATTTTGTGATA	GTGCTGAATC	TATTTCTACT	ATGCGGAATC		- 481
- 480	TATTTCTAT	TAAATCTATT	GAGTGCTTTG	AGGTTTTTGA	TGACGCTGAA	TCCATTAAAT		- 421
- 420	ATTTTGAAT	TTTTTATAAC	ATTGAATTAA	TTTCTTCCAT	AAATGAAAGT	TCAAACACTC		- 361
- 360	TTACTTACCA	CCCTATTTT	ATAAAAAATA	CCAAATTCGG	TGATTTTGAA	CCATCCTGGC		- 301
- 300	MRE SV40 GBox	AAATTGAGA	CCTCACTAGA	GAAGGGCAGC	ATTTATTACT	GCAAAAGAAA	GATTTCCAGA	- 241
- 240	CAAATGATGT	CCAACCACTC	AACGAGTAAA	CAATACGACA	CACTGTGTTG	TTCCGCGACA		- 181
- 180	ACGATCGGTT	CCAGTGTGGT	CGCTGGGGAG	TGGGTGGCTT	GCTAGGGAAT	TTCCCATCTC		- 121
- 120	CAACCACTC	CACTTTCCTT	TACTTCCCGG	AAAGATCCAT	CAATGGAAAG	GGGCAGAAAT		- 61
- 60	TGTCGACTGA	AGGTGATAAA	AGCACCGTAG	CCCCAAATCT	TTTCATTTCGT	ACTATTTTCT		- 1
1	GGTGCTCCTC	TTACCCAATT	TTGTGTGTGA	GAATTGGATT	CGAAATGGGA	TCGGCTCCG		60
61	AAAGCTCAGA	GATGAATGCG	AAGATTGTGA	ATGAAGATGA	ATGGCTTCTG	GGCATGGAAC		120
121	TCGGGAATTT	CTCCTGCGTT	CCTATGGCTA	TGAAGGCAGC	CATTGAGCTC	GATGTCCTCC		180
181	AAATCATAGC	AAATGCCGGC	AATGGCGTCC	AGCTCTCGCC	CAGACAAATC	GTTGCCACAC		240
241	TTCCGACCAC	GAACCCCGAC	GCTGCCATTA	CACTTGATCG	GATCCTCAGA	GTGTTAGCCA		300
301	GCCATTCGGT	TCTGAGCTGC	TCTGTGACCA	CGGACGAGAA	TGGCAAGGCC	GAGAGGCTCT		360
361	ATGGCCTCAC	TCCTCTCTGC	AAATATCTGG	TCAAGAACCA	GGATGGAGTT	TCTCTGGCTC		420
421	CATTGGTGT	GATGAATCAA	GATAAGGTGT	TGATGGAGTC	CTGGTATTAT	CTCAAGGACG		480
481	CGGTGCTGGA	TGGTTCCAG	CCATTCACCA	AAGCCCATGG	AATGAATGCG	TTGAGTACC		540
541	CAGCCATGGA	CCAGAGATTC	AACCGGGTTT	TCAACCGGGG	AATGGCTGAG	CATTCTACCA		600
601	TGTTAGTGAA	CAAGATTCTG	GATACTTACG	AGGGTTTAA	GGAGGTTTCA	GAATTGGTGG		660
661	ATGTGGGAGG	AGGAGTTGGG	TCGACTCTCA	ATCTCATAGT	CTCGAAGTAT	CCCCACATTT		720
721	CAGGAATCAA	CTTTGACATG	CCCCATGTGG	TGGCCGATGC	TCCTCACTAT	CCAGCTGTGA		780
780	AACATGTGGG	TGGAGACATG	TTTGATAGCG	TACCAAGTGG	CCAAGCTATC	TTTATGAAGG		840
841	TATGGCATTG	AATTTCTGGT	GTTGGGGAGC	TTCATATGAA	AATTGAGATT	GGATGAATAG		900
901	ACAGAGACCT	TACTGTATCT	ATCAATGTTG	TTTGATTGCA	GTGGATCCTG	CACGATTGGA		960
961	CGCATGATCA	TTGCTTGAGG	CTTTTGAAGA	ATTGTCACAA	GGCATTGCCA	GAGAAAGGGA		1020
1021	AAGTGATTGT	GGTGGACACC	ATTCTCCCTG	TTGCTGCAGA	GACATCTCCC	TATGCTCGCC		1080
1081	AGGGATTTCA	TATAGATCTG	TTGATGTTGG	CGTACAATCC	AGGAGGCAAG	GAGCGCACAG		1140
1141	AGCAAGAATT	TCGAGATTTG	GCTAAAGAGG	TGGGATTGTC	AGGTGGCGTT	AAACCTGTCT		1200
1201	GTTGTGTCAA	TGGACATTGG	GTAATGGAAT	TCCACAAGTA	ACTCTTCATT	AGATCGCAGT		1260
1261	TGGATTATCT	TCCACGTCGG	CGGCGACATG	TTA				1293

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: GSF-Forschungszentrum fuer Umwelt und
Gesundheit GmbH
- (B) STRASSE: Ingolstaedter Landstrasse 1
- (C) ORT: Neuherberg
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 85764

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Ozon- und/oder Pathogen-induzierbare
Genexpression in Pflanzen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 3

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1908 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CATTTCTCCC TAAATCTATT AGGTACTTTG GGGTTTTTGA TAGTGCTGAA TCTATTTCTG	60
CTGTGCGGAA TCTATAATCT ATTAGATACT TTGGGATTTT TGATAGTGCT GAATCTATTT	120
CTACTATGCG GAATCTATTT CCTATTAAAT CTATTGAGTG CTTTGAGGTT TTTGATGACG	180
CTGAATCCAT TAAATATTTT GGAATTTTTT ATAACATTGA ATTAATTTCT TCCATAAATG	240
AAAGTTCAAA CACTCTTACT TACCACCCTA TTTTTATAAA AATAACCAAA TTCGGTGATT	300
TTGAACCATC CTGGCAAATT TGAGACCTCA CTAGAGAAGG GCAGCATTTA TTAGTGCAAA	360
AGAAAGATTT CCAGACAAAT GATGTCCAAC CACTCAACGA GTAAACAATA CGACACACTG	420
TGTTGTTCCG CGACAACGAT CGGTTCCAGT GTGGTCGCTG GGGAGTGGGT GGCTTGGTAG	480
GGAATTTCCC ATCTCCAACC ACCTCCACTT TCCTTTACTT CCCGGAAGA TCCATCAATG	540
GAAAGGGGCA GAATTTGTCT ACTGAAGGTG ATAAAAGCAC CGTAGCCCCA AATCTTTTCA	600
TTCGTACTAT TTTCTGGTGC TCCTCTTACC CAATTTTGT GTGTAGAATT GGATTGAAA	660
TGGGATCGGC TTCCGAAAGC TCAGAGATGA ATGCGAAGAT TGTGAATGAA GATGAATGGC	720
TTCTGGGCAT GGAACCTCGG AATTTCTCCT GCGTTCCTAT GGCTATGAAG GCAGCCATTG	780

AGCTCGATGT CCTCCAAATC ATAGCAAATG CCGGCAATGG CGTCCAGCTC TCGCCCAGAC	840
AAATCGTTGC CCACATTCCG ACCACGAACC CCGACGCTGC CATTACACTT GATCGGATCC	900
TCAGAGTGTT AGCCAGCCAT TCGGTTCTGA GCTGCTCTGT GACCACGGAC GAGAATGGCA	960
AGGCCGAGAG GCTCTATGGC CTCACTCCTC TCTGCAAATA TCTGGTCAAG AACCAGGATG	1020
GAGTTTCTCT GGCTCCATTG GTGTTGATGA ATCAAGATAA GGTGTTGATG GAGTCCTGGT	1080
ATTATCTCAA GGACGCGGTG CTGGATGGTT CCCAGCCATT CACCAAAGCC CATGGAATGA	1140
ATGCGTTCGA GTACCCAGCC ATGGACCAGA GATTCAACCG GGTTTTCAAC CGGGGAATGG	1200
CTGAGCATTG TACCATGTTG ATGAACAAGA TTCTGGATAC TTACGAGGGT TTTAAGGAGG	1260
TTCAGGAATT GGTGGATGTG GGAGGAGGAG TTGGGTCGAC TCTCAATCTC ATAGTCTCGA	1320
AGTATCCCCA CATTTTCAGGA ATCAACTTTG ACATGCCCCA TGTGGTGGCC GATGCTCCTC	1380
ACTATCCAGC TGTGAAACAT GTGGGTGGAG ACATGTTTGA TAGCGTACCA AGTGGCCAAG	1440
CTATCTTTAT GAAGGTATGG CATTGAATTT CTGGTGTGTTGG GGAGCTTCAT ATGAAAATTG	1500
AGATTGGATG AATAGACAGA GACCTTACTG TATCTATCAA TGTGTTTGA TTGCAGTGGA	1560
TCCTGCACGA TTGGAGCGAT GATCATTGCT TGAGGCTTTT GAAGAATTGT CACAAGGCAT	1620
TGCCAGAGAA AGGGAAAGTG ATTGTGGTGG ACACCATTTCT CCCTGTTGCT GCAGAGACAT	1680
CTCCCTATGC TCGCCAGGGA TTTCATATAG ATCTGTTGAT GTTGGCGTAC AATCCAGGAG	1740
GCAAGGAGCG CACAGAGCAA GAATTTTCGAG ATTTGGCTAA AGAGGTGGGA TTTGCAGGTG	1800
GCGTTAAACC TGTCTGTTGT GTCAATGGAC ATTGGGTAAT GGAATTCCAC AAGTAACTCT	1860
TCATTAGATC GCAGTTGGAT TATCTTCCAC GTCGGCGGCG ACATGTTA	1908

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1908 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: join(660..1454, 1557..1853)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

CATTTCTCCC TAAATCTATT AGGTACTTTG GGGTTTTTGA TAGTGCTGAA TCTATTTCTG	60
CTGTGCGGAA TCTATAATCT ATTAGATACT TTGGGATTTT TGATAGTGCT GAATCTATTT	120
CTACTATGCG GAATCTATTT CCTATTAAAT CTATTGAGTG CTTTGAGGTT TTTGATGACG	180
CTGAATCCAT TAAATATTTT GGAATTTTTT ATAACATTGA ATTAATTTCT TCCATAAATG	240

AAAGTTCAAA CACTCTTACT TACCACCCTA TTTTATAAA AATAACCAAA TTCGGTGATT	300
TTGAACCATC CTGGCAAATT TGAGACCTCA CTAGAGAAGG GCAGCATTTA TTAGTCAAAA	360
AGAAAGATTT CCAGACAAAT GATGTCCAAC CACTCAACGA GTAAACAATA CGACACACTG	420
TGTTGTTCCG CGACAACGAT CGGTTCCAGT GTGGTCGCTG GGGAGTGGGT GGCTTGGTAG	480
GGAATTTCCC ATCTCCAACC ACCTCCACTT TCCTTTACTT CCCGAAAGA TCCATCAATG	540
GAAAGGGGCA GAATTTGTCTG ACTGAAGGTG ATAAAAGCAC CGTAGCCCCA AATCTTTTCA	600
TTCGTACTAT TTTCTGGTGC TCCTCTTACC CAATTTTTGT GTGTAGAATT GGATTGAA	659
ATG GGA TCG GCT TCC GAA AGC TCA GAG ATG AAT GCG AAG ATT GTG AAT	707
Met Gly Ser Ala Ser Glu Ser Ser Glu Met Asn Ala Lys Ile Val Asn	
1 5 10 15	
GAA GAT GAA TGG CTT CTG GGC ATG GAA CTC GGG AAT TTC TCC TGC GTT	755
Glu Asp Glu Trp Leu Leu Gly Met Glu Leu Gly Asn Phe Ser Cys Val	
20 25 30	
CCT ATG GCT ATG AAG GCA GCC ATT GAG CTC GAT GTC CTC CAA ATC ATA	803
Pro Met Ala Met Lys Ala Ala Ile Glu Leu Asp Val Leu Gln Ile Ile	
35 40 45	
GCA AAT GCC GGC AAT GGC GTC CAG CTC TCG CCC AGA CAA ATC GTT GCC	851
Ala Asn Ala Gly Asn Gly Val Gln Leu Ser Pro Arg Gln Ile Val Ala	
50 55 60	
CAC ATT CCG ACC ACG AAC CCC GAC GCT GCC ATT ACA CTT GAT CGG ATC	899
His Ile Pro Thr Thr Asn Pro Asp Ala Ala Ile Thr Leu Asp Arg Ile	
65 70 75 80	
CTC AGA GTG TTA GCC AGC CAT TCG GTT CTG AGC TGC TCT GTG ACC ACG	947
Leu Arg Val Leu Ala Ser His Ser Val Leu Ser Cys Ser Val Thr Thr	
85 90 95	
GAC GAG AAT GGC AAG GCC GAG AGG CTC TAT GGC CTC ACT CCT CTC TGC	995
Asp Glu Asn Gly Lys Ala Glu Arg Leu Tyr Gly Leu Thr Pro Leu Cys	
100 105 110	
AAA TAT CTG GTC AAG AAC CAG GAT GGA GTT TCT CTG GCT CCA TTG GTG	1043
Lys Tyr Leu Val Lys Asn Gln Asp Gly Val Ser Leu Ala Pro Leu Val	
115 120 125	
TTG ATG AAT CAA GAT AAG GTG TTG ATG GAG TCC TGG TAT TAT CTC AAG	1091
Leu Met Asn Gln Asp Lys Val Leu Met Glu Ser Trp Tyr Tyr Leu Lys	
130 135 140	
GAC GCG GTG CTG GAT GGT TCC CAG CCA TTC ACC AAA GCC CAT GGA ATG	1139
Asp Ala Val Leu Asp Gly Ser Gln Pro Phe Thr Lys Ala His Gly Met	
145 150 155 160	
AAT GCG TTC GAG TAC CCA GCC ATG GAC CAG AGA TTC AAC CGG GTT TTC	1187
Asn Ala Phe Glu Tyr Pro Ala Met Asp Gln Arg Phe Asn Arg Val Phe	
165 170 175	
AAC CGG GGA ATG GCT GAG CAT TCT ACC ATG TTG ATG AAC AAG ATT CTG	1235
Asn Arg Gly Met Ala Glu His Ser Thr Met Leu Met Asn Lys Ile Leu	
180 185 190	

GAT ACT TAC GAG GGT TTT AAG GAG GTT CAG GAA TTG GTG GAT GTG GGA	1283
Asp Thr Tyr Glu Gly Phe Lys Glu Val Gln Glu Leu Val Asp Val Gly	
195 200 205	
GGA GGA GTT GGG TCG ACT CTC AAT CTC ATA GTC TCG AAG TAT CCC CAC	1331
Gly Gly Val Gly Ser Thr Leu Asn Leu Ile Val Ser Lys Tyr Pro His	
210 215 220	
ATT TCA GGA ATC AAC TTT GAC ATG CCC CAT GTG GTG GCC GAT GCT CCT	1379
Ile Ser Gly Ile Asn Phe Asp Met Pro His Val Val Ala Asp Ala Pro	
225 230 235 240	
CAC TAT CCA GCT GTG AAA CAT GTG GGT GGA GAC ATG TTT GAT AGC GTA	1427
His Tyr Pro Ala Val Lys His Val Gly Gly Asp Met Phe Asp Ser Val	
245 250 255	
CCA AGT GGC CAA GCT ATC TTT ATG AAG GTATGGCATT GAATTTCTGG	1474
Pro Ser Gly Gln Ala Ile Phe Met Lys	
260 265	
TGTTGGGGAG CTTCATATGA AAATTGAGAT TGGATGAATA GACAGAGACC TTACTGTATC	1534
TATCAATGTT GTTTGATTGC AG TGG ATC CTG CAC GAT TGG AGC GAT GAT CAT	1586
Trp Ile Leu His Asp Trp Ser Asp Asp His	
270 275	
TGC TTG AGG CTT TTG AAG AAT TGT CAC AAG GCA TTG CCA GAG AAA GGG	1634
Cys Leu Arg Leu Leu Lys Asn Cys His Lys Ala Leu Pro Glu Lys Gly	
280 285 290	
AAA GTG ATT GTG GTG GAC ACC ATT CTC CCT GTT GCT GCA GAG ACA TCT	1682
Lys Val Ile Val Val Asp Thr Ile Leu Pro Val Ala Ala Glu Thr Ser	
295 300 305	
CCC TAT GCT CGC CAG GGA TTT CAT ATA GAT CTG TTG ATG TTG GCG TAC	1730
Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Phe His Ile Asp Leu Leu Met Leu Ala Tyr	
310 315 320	
AAT CCA GGA GGC AAG GAG CGC ACA GAG CAA GAA TTT CGA GAT TTG GCT	1778
Asn Pro Gly Gly Lys Glu Arg Thr Glu Gln Glu Phe Arg Asp Leu Ala	
325 330 335	
AAA GAG GTG GGA TTT GCA GGT GGC GTT AAA CCT GTC TGT TGT GTC AAT	1826
Lys Glu Val Gly Phe Ala Gly Gly Val Lys Pro Val Cys Cys Val Asn	
340 345 350 355	
GGA CAT TGG GTA ATG GAA TTC CAC AAG TAACTCTTCA TTAGATCGCA	1873
Gly His Trp Val Met Glu Phe His Lys	
360	
GTTGGATTAT CTTCCACGTC GGCGGCGACA TGTTA	1908

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 364 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Met	Gly	Ser	Ala	Ser	Glu	Ser	Ser	Glu	Met	Asn	Ala	Lys	Ile	Val	Asn	
1				5					10					15		
Glu	Asp	Glu	Trp	Leu	Leu	Gly	Met	Glu	Leu	Gly	Asn	Phe	Ser	Cys	Val	
			20					25					30			
Pro	Met	Ala	Met	Lys	Ala	Ala	Ile	Glu	Leu	Asp	Val	Leu	Gln	Ile	Ile	
		35					40					45				
Ala	Asn	Ala	Gly	Asn	Gly	Val	Gln	Leu	Ser	Pro	Arg	Gln	Ile	Val	Ala	
		50				55					60					
His	Ile	Pro	Thr	Thr	Asn	Pro	Asp	Ala	Ala	Ile	Thr	Leu	Asp	Arg	Ile	
65					70					75					80	
Leu	Arg	Val	Leu	Ala	Ser	His	Ser	Val	Leu	Ser	Cys	Ser	Val	Thr	Thr	
				85					90					95		
Asp	Glu	Asn	Gly	Lys	Ala	Glu	Arg	Leu	Tyr	Gly	Leu	Thr	Pro	Leu	Cys	
			100					105					110			
Lys	Tyr	Leu	Val	Lys	Asn	Gln	Asp	Gly	Val	Ser	Leu	Ala	Pro	Leu	Val	
		115					120					125				
Leu	Met	Asn	Gln	Asp	Lys	Val	Leu	Met	Glu	Ser	Trp	Tyr	Tyr	Leu	Lys	
	130					135					140					
Asp	Ala	Val	Leu	Asp	Gly	Ser	Gln	Pro	Phe	Thr	Lys	Ala	His	Gly	Met	
145					150					155					160	
Asn	Ala	Phe	Glu	Tyr	Pro	Ala	Met	Asp	Gln	Arg	Phe	Asn	Arg	Val	Phe	
			165					170						175		
Asn	Arg	Gly	Met	Ala	Glu	His	Ser	Thr	Met	Leu	Met	Asn	Lys	Ile	Leu	
			180					185					190			
Asp	Thr	Tyr	Glu	Gly	Phe	Lys	Glu	Val	Gln	Glu	Leu	Val	Asp	Val	Gly	
		195					200					205				
Gly	Gly	Val	Gly	Ser	Thr	Leu	Asn	Leu	Ile	Val	Ser	Lys	Tyr	Pro	His	
	210					215					220					
Ile	Ser	Gly	Ile	Asn	Phe	Asp	Met	Pro	His	Val	Val	Ala	Asp	Ala	Pro	
225				230						235					240	
His	Tyr	Pro	Ala	Val	Lys	His	Val	Gly	Gly	Asp	Met	Phe	Asp	Ser	Val	
			245					250						255		
Pro	Ser	Gly	Gln	Ala	Ile	Phe	Met	Lys	Trp	Ile	Leu	His	Asp	Trp	Ser	
			260					265					270			
Asp	Asp	His	Cys	Leu	Arg	Leu	Leu	Lys	Asn	Cys	His	Lys	Ala	Leu	Pro	
		275					280					285				
Glu	Lys	Gly	Lys	Val	Ile	Val	Val	Asp	Thr	Ile	Leu	Pro	Val	Ala	Ala	
	290					295					300					
Glu	Thr	Ser	Pro	Tyr	Ala	Arg	Gln	Gly	Phe	His	Ile	Asp	Leu	Leu	Met	
305					310					315					320	
Leu	Ala	Tyr	Asn	Pro	Gly	Gly	Lys	Glu	Arg	Thr	Glu	Gln	Glu	Phe	Arg	
			325					330						335		

Asp Leu Ala Lys Glu Val Gly Phe Ala Gly Gly Val Lys Pro Val Cys
340 345 350

Cys Val Asn Gly His Trp Val Met Glu Phe His Lys
355 360