



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 37 951 T2** 2007.11.15

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 943 001 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 37 951.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/21145**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 948 384.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/022601**

(86) PCT-Anmeldetag: **18.11.1997**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **28.05.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **22.09.1999**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **25.07.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **15.11.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/82** (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

31045 P **18.11.1996** **US**

(73) Patentinhaber:

**University of Florida Research Foundation, Inc.,
Gainesville, Fla., US**

(74) Vertreter:

**Barz, P., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 80803
München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**HANNAH, L. Curtis, Gainesville, FL 32606, US;
GREENE, Tom W., Gainesville, FL 32607, US**

(54) Bezeichnung: **HITZESTABILE MUTANTEN VON ENZYMEN DER STÄRKEBIOSYNTHESE**

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

Hintergrund der Erfindung

[0001] Die sessile Natur des Pflanzenlebens führt zu einer konstanten Belastung durch Umweltfaktoren, die positive und negative Einflüsse auf das Wachstum und die Entwicklung der Pflanze ausüben. Eines der Haupthindernisse, die in der modernen Landwirtschaft auftreten, sind nachteilige Umweltbedingungen. Ein wesentlicher Faktor, der zu erheblichen Ernteverlusten führt, ist der Hitzestress. Ein Temperaturstress bewirkt bei zahlreichen Getreidepflanzen, wie Mais, Weizen und Gerste, eine starke Verringerung der Kornausbeute. Bei Getreidepflanzen, die weltweit von Bedeutung sind, liegen die Ausbeuteverringerungen aufgrund von Hitzestress im Bereich von 7 bis 35 %.

[0002] Eine Anzahl von Studien hat wahrscheinliche physiologische Konsequenzen von Hitzestress identifiziert. Eine frühe Arbeit von Hunter et al. (R. B. Hunter, M. Tollenaar und C. M. Breuer, *Can. J. Plant Sci.*, Bd. 57 (1977), S. 1127–1133) unter Anwendung von Wachstumskammerbedingungen hat gezeigt, dass bei Mais eine erhöhte Temperatur eine Verringerung der Dauer der Kornfüllung bewirkt. Ähnliche Ergebnisse, bei denen die Dauer der Kornfüllung durch erhöhte Temperaturen nachteilig beeinflusst wird, wurden von Tollenaar und Bruulsema identifiziert (M. Tollenaar und T. W. Bruulsema, *Can. J. Plant Sci.*, Bd. 68 (1988), S. 935–940). Badu-Apraku et al. (B. Badu-Apraku, R. B. Hunter und M. Tollenaar, *Can. J. Plant Sci.*, Bd. 63 (1983), S. 357–363) maßen eine ausgeprägte Verringerung der Ausbeute an Maispflanzen, die unter Tag/Nacht-Temperaturbedingungen von 35/15 °C gezüchtet worden waren, im Vergleich zu einem Wachstum bei einem 25/15 °C-Temperaturbereich. Verringerte Erträge aufgrund von erhöhten Temperaturen werden auch durch historische und klimatologische Studien belegt (L. M. Thompson, *Agron. J.*, Bd. 78 (1986), S. 649–653; L. M. Thompson, *Science*, Bd. 188 (1975), S. 535–541; J. Chang, *Agricul. Meteorol.*, Bd. 24 (1981), S. 253–262; und J. P. Conroy, S. Seneweera, A. S. Basra, G. Rogers und B. Nissen-Wooler, *Aust. J. Plant Physiol.*, Bd. 21 (1994), S. 741–758).

[0003] Die Tatsache, dass die physiologischen Vorgänge des sich entwickelnden Samens in nachteiliger Weise durch Hitzestress beeinflusst werden, ergibt sich aus Studien unter Verwendung eines in vitro-Kornkultursystems (R. J. Jones, B. G. Gengenbach und V. B. Cardwell, *Crop Science*, Bd. 21 (1981), S. 761–766; R. J. Jones, S. Ouattar und R. K. Crookston, *Crop Science*, Bd. 24 (1984), S. 133–137; und N. Cheikh und R. J. Jones, *Physiol. Plant*, Bd. 95 (1995), S. 59–66).

[0004] Oberhalb der optimalen Temperatur von 35 °C gezüchtete Maiskörner zeigten eine drastische Gewichtsverringerung.

[0005] Arbeiten mit Weizen identifizierten den Verlust an löslicher Stärke-Synthase (SSS)-Aktivität als prägendes Merkmal der Reaktion von Weizenendosperm auf Hitzestress (J. S. Hawker und C. F. Jenner, *Aust. J. Plant Physiol.*, Bd. 20 (1993), S. 197–209; K. Denver, C. M. Hylton und A. M. Smith, *Aust. J. Plant Physiol.*, Bd. 21 (1994), S. 783–789; C. F. Jenner, *Aust. J. Plant Physiol.*, Bd. 21 (1994), S. 791–806). Weitere Studien mit SSS von Weizenendosperm zeigen, dass dieses hitzelabil ist (A. H. G. C. Rijken, *Plant Physiol.*, Bd. 81 (1986), S. 448–453; P. L. Keeling, P. J. Bacon, D. C. Holt, *Planta*, Bd. 191 (1993), S. 342–348; C. F. Jenner, K. Denver und J. Guerin, *Aust. J. Plant Physiol.*, Bd. 22 (1995), S. 703–709).

[0006] Die Rollen von SSS und ADP-Glucose-pyrophosphorylase (AGP) unter Hitzestress-Bedingungen bei Mais sind weniger klar. AGP katalysiert die Umwandlung von ATP und α -Glucose-1-phosphat zu ADP-Glucose und Pyrophosphat. ADP-Glucose wird als Glycosyl-Donator von Pflanzen bei der Stärkebiosynthese und von Bakterien bei der Glycogenbiosynthese verwendet. Die Bedeutung von ADP-Glucose-pyrophosphorylase als Schlüsselenzym bei der Regulierung der Stärkebiosynthese wurde bei einer Studie über Mutanten mit Stärkemangel von Mais (*Zea mays*)-Endosperm festgestellt (C. Y. Tsai und O. E. Nelson Jr., *Science*, Bd. 151 (1966), S. 341–343; D. B. Dickinson, J. Preiss, *Plant Physiol.*, Bd. 44 (1969), S. 1058–1062).

[0007] Ou-Lee und Setter (T. Ou-Lee und T. L. Setter, *Plant Physiol.*, Bd. 79 (1985), S. 852–855) untersuchten die Einflüsse der Temperatur auf apikale oder Spitzenregionen von Maiskolben. Bei erhöhten Temperaturen war die AGP-Aktivität während der Zeit der intensiven Stärkeablagerung in apikalen Körnern größer als in basalen Körnern. Im Gegensatz dazu war in bei Normaltemperaturen entwickelten Körnern die AGP-Aktivität in apikalen und basalen Körnern während dieser Periode ähnlich. Jedoch wurde die Aktivität von Stärke-Synthase während dieses Zeitraums in apikalen und basalen Körnern nicht differenziell beeinflusst. Ferner zeigten wärmebehandelte apikale Körner eine Zunahme der Stärke-Synthase-Aktivität gegenüber der Kontrolle. Dies wurde bei der AGP-Aktivität nicht festgestellt. Singletary et al. (G. W. Singletary, R. Banisadr und P. L. Keeling, *Plant Physiol.*, Bd. 102 (1993), (suppl.), S. 6; G. W. Singletary, R. Banisadr und P. L. Keeling, *Aust. J. Plant*

Physiol., Bd. 21 (1994), S. 829–841) bestimmten unter Anwendung eines in vitro-Kultursystems den Einfluss verschiedener Temperaturen während der Kornfüllungsperiode. Das Samengewicht nahm mit einer Temperatursteigerung von 22–36 °C stetig ab. Eine Rolle für AGP beim Ertragsverlust wird auch durch die Arbeit von Duke und Doehlert (E. R. Duke und D. C. Doehlert, *Environ. Exp. Botany*, Bd. 36 (1996), S. 199–208) gestützt.

[0008] In der Arbeit von Keeling et al. (1994, a.a.O.) wurde die SSS-Aktivität in Mais und Weizen unter Anwendung einer Q_{10} -Analyse quantitativ bestimmt. Es wurde festgestellt, dass SSS einen wichtigen Kontrollpunkt beim Übergang von Kohlenstoff zu Stärke darstellt.

[0009] Biochemische in vitro-Studien mit AGP und SSS zeigen klar, dass beide Enzyme hitzelabil sind. Mais-Endosperm-AGP verliert 96 % seiner Aktivität, wenn es 5 Minuten auf 57 °C erwärmt wird (L. C. Hannah, D. M. Tuschall und R. J. Mans, *Genetics*, Bd. 95 (1980), S. 961–970). Dies steht im Gegensatz zu Kartoffel-AGP, die bei 70 °C völlig stabil ist (J. R. Sowokinos und J. Preiss, *Plant Physiol.*, Bd. 69 (1982), S. 1459–1466; T. W. Okita, P. A. Nakata, J. M. Anderson, J. Sowokinos, J. Morel) und J. Preiss, *Plant Physiol.*, Bd. 93 (1990), S. 785–790). Hitzeinaktivierungsstudien mit SSS ergaben, dass diese bei höheren Temperaturen ebenfalls labil ist, und durch kinetische Studien wurde festgestellt, dass der Km-Wert für Amylopectin exponentiell anstieg, wenn die Temperatur von 25 auf 45 °C erhöht wurde (Jenner et al., 1995, a.a.O.).

[0010] Durch biochemische und genetische Hinweise wurde AGP als Schlüsselenzym bei der Stärkebiosynthese in höheren Pflanzen und bei der Glycogenbiosynthese in *E. coli* ermittelt (J. Preiss und R. Romeo, *Progress in Nuc. Acid Res. and Mol. Biol.*, Bd. 47 (1994), S. 299–329; J. Preiss und M. Sivak, "Starch synthesis in sinks and sources", in *Photoassimilate distribution in plants and crops: source-sink relationships*, Hrsg. E. Zamski, Marcel Dekker Inc., (1996), S. 139–168). AGP katalysiert die Stufe, die beim Stärke-Biosyntheseweg als Anfangsstufe angesehen wird, wobei es sich beim Reaktionsprodukt um den aktivierten Glucosyl-Donator, nämlich ADP-Glucose, handelt. Dieser wird von Stärke-Synthase für die Erweiterung des Polysaccharid-Polymeren verwendet (Übersichtsartikel von L. Curtis Hannah, "Starch synthesis in the maize endosperm", in: *Advances in Cellular and Molecular Biology of Plants*, Bd. 4, Hrsg. B. A. Larkins und I. K. Vasil, *Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development*, Kluwer Academic Publishers, (1996), Dordrecht, Niederlande (im Druck)).

[0011] Anfängliche Studien mit Kartoffel-AGP zeigten, dass die Expression in *E. coli* zu einem Enzym mit allosterischen und kinetischen Eigenschaften, die denen des nativen Knollenenzym sehr ähnlich waren, führte (A. Iglesias, G. F. Barry, C. Meyer, L. Bloksberg, P. Nakata, T. Greene, M. J. Laughlin, T. W. Okita, G. M. Kishore und J. Preiss, *J. Biol. Chem.*, Bd. 268 (1993), S. 1081–1086; M. A. Ballicora, M. J. Laughlin, Y. Fu, T. W. Okita, G. F. Barry und J. Preiss, *Plant Physiol.*, Bd. 109 (1995), S. 245–251). Greene et al. (T. W. Greene, S. E. Chantler, M. L. Kahn, G. F. Barry, J. Preiss und T. W. Okita, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Bd. 93 (1996), S. 1509–1513; T. W. Greene, R. L. Woodbury und T. W. Okita, *Plant Physiol.*, (1996b) (im Druck)) zeigten in ihren Struktur-Funktions-Studien mit Kartoffel-AGP die Eignung des bakteriellen Expressionssystems. Multiple Mutationen, die bei der Kartierung von allosterischen und Substrat-Bindungsstellen von Bedeutung sind, wurden identifiziert (T. W. Okita, T. W. Greene, M. J. Laughlin, P. Salamone, R. Woodbury, S. Choi, H. Ito, H. Kavakli und K. Stephens, "Engineering Plant Starches by the Generation of Modified Plant Biosynthetic Enzymes", in *Engineering Crops for Industrial End Uses*, Hrsg. P. R. Shewry, J. A. Napier und P. Davis, Portland Press Ltd., (1996), London (im Druck)).

[0012] AGP-Enzyme wurden sowohl aus Bakterien als auch aus Pflanzen isoliert. Bakterielle AGP besteht aus einem Homotetrameren, während es sich bei Pflanzen-AGP aus photosynthetischen und nicht-photosynthetischen Geweben um ein Heterotetrameres aus zwei verschiedenen Untereinheiten handelt. Das Pflanzenenzym wird durch zwei verschiedene Gene kodiert, wobei eine Untereinheit größer als die andere ist. Dieses Merkmal wurde bei einer Anzahl von Pflanzen festgestellt. Die AGP-Untereinheiten in Spinatblättern weisen Molekulargewichte von 54 kDa und 51 kDa auf, wie durch SDS-PAGE festgestellt wird. Beide Untereinheiten sind mit Antikörper gegen gereinigte AGP aus Spinatblättern immunoreaktiv (L. Copeland, J. Preiss, *Plant Physiol.*, Bd. 68 (1981), S. 996–1001; M. Morell, M. Bloon, V. Knowles, J. Preiss *J. Bio. Chem.*, Bd. 263 (1988), S. 633). Eine immunologische Analyse unter Verwendung von Antiserum gegen die kleinen und großen Untereinheiten von Spinatblättern ergab, dass Kartoffelknollen-AGP ebenfalls durch zwei Gene kodiert wird (Okita et al., 1990, a.a.O.). Die cDNA-Klone der zwei Untereinheiten von Kartoffelknollen (50 und 51 kDa) wurden ebenfalls isoliert und sequenziert (B. T. Muller-Rober, J. Kossmann, L. C. Hannah, L. Willmitzer, U. Sounewald, *Mol. Gen. Genet.*, Bd. 224 (1990), S. 136–146; P. A. Nakata, T. W. Greene, J. M. Anderson, B. J. Smith-White, T. W. Okita, *J. Preiss Plant Mol. Biol.*, Bd. 17 (1991), S. 1089–1093). Die große Untereinheit von Kartoffelknollen-AGP ist hitzestabil (Nakata et al., (1991), a.a.O.).

[0013] Gemäß der Annahme von Hannah und Nelson (L. C. Hannah, O. E. Nelson, *Plant Physiol.*, Bd. 55 (1975), S. 297–302; L. C. Hannah und O. E. Nelson Jr., *Biochem. Genet.*, Bd. 14 (1976), S. 547–560) handelt es sich sowohl bei Shrunken-2 (Sh2) (M. R. Bhave, S. Lawrence, C. Barton, L. C. Hannah, *Plant Cell*, Bd. 2 (1990), S. 581–588) als auch bei Brittle-2 (Bt2) (J. M. Bae, M. Giroux, L. C. Hannah, *Maydica*, Bd. 35 (1990), S. 317–322) um Strukturgene von Mais-Endosperm-ADP-Glucose-pyrophosphorylase. Sh2 und Bt2 kodieren für die große bzw. kleine Untereinheit des Enzyms. Aufgrund der cDNA-Sequenzierung wurde für die Sh2- und Bt2-Proteine ein Molekulargewicht von 57 179 Da (J. R. Shaw, L. C. Hannah, *Plant Physiol.*, Bd. 98 (1992), S. 1214–1216) bzw. von 52 224 Da vorhergesagt. Das Endosperm ist die Stelle der stärksten Stärkeablagerung während der Kornentwicklung bei Mais. Sh2- und Bt2-Mais-Endosperm-Mutanten weisen stark verringerte Stärkegrade auf, die dem mangelnden Grad an AGP-Aktivität entsprechen. Von Mutationen beider Gene wurde gezeigt, dass sie die AGP-Aktivität um etwa 95 % verringern (Tsai und Nelson, 1966, a.a.O.; Dickinson und Preiss, 1969, a.a.O.). Ferner wurde festgestellt, dass die enzymatischen Aktivitäten mit der Dosierung von funktionellen Wildtyp-Sh2- und Bt2-Allelen zunehmen, während mutante Enzyme veränderte kinetische Eigenschaften besitzen. AGP stellt die geschwindigkeitsbestimmende Stufe bei der Stärkebiosynthese in Pflanzen dar. Stark et al. platzierten eine mutante Form von *E. coli*-AGP in Kartoffelknollen und erzielten eine 35%ige Zunahme des Stärkegehalts (Stark et al., *Science*, Bd. 258 (1992), S. 287).

[0014] Die Klonierung und Charakterisierung der Gene, die für die AGP-Enzymuntereinheiten kodieren, wurde für verschiedene Pflanzen beschrieben. Hierzu gehören Sh2-cDNA (Bhave et al., 1990, a.a.O.), Sh2-Genom-DNA (Shaw und Hannah, 1992, a.a.O.) und Bt2-cDNA (Bae et al., 1990, a.a.O.) aus Mais; cDNA der kleinen Untereinheit (J. M. Anderson, J. Hnilo, R. Larson, T. W. Okita, M. Morell, J. Preiss, *J. Biol. Chem.*, Bd. 264 (1989), S. 12238–12242) und genomische DNA (J. M. Anderson, R. Larson, D. Landencia, W. T. Kim, D. Morrow, T. W. Okita, J. Preiss, *Gene*, Bd. 97 (1991), S. 199–205) aus Reis; und cDNAs der kleinen und großen Untereinheit aus Spinatblättern (Morell et al., 1988, a.a.O.) und Kartoffelknollen (Muller-Rober et al., 1990, a.a.O.; P. A. Nakata, T. W. Greene, J. W. Anderson, B. J. Smith-White, T. W. Okita und J. Preiss, *Plant Mol. Biol.*, Bd. 17 (1991), S. 1089–1093). Ferner wurden cDNA-Klone aus Weizen-Endosperm und Blattgewebe isoliert (M. R. Olive, R. J. Ellis, W. W. Schuch, *Plant Physiol. Mol. Biol.*, Bd. 12 (1989), S. 525–538) und Blättern von *Arabidopsis thaliana* (T. Lin, T. Caspar, C. R. Sommerville und J. Preiss, *Plant Physiol.*, Bd. 88 (1988), S. 1175–1181).

[0015] AGP wirkt in sämtlichen bisher untersuchten Geweben und Organismen als ein allosterisches Enzym. Die Bedeutung der allosterischen Eigenschaften von AGP wurde zuerst in *E. coli* gezeigt. Es wurde eine *E. coli*-Mutante mit Glycogen-Überproduktion isoliert und die Mutation wurde auf das Strukturgen für AGP mit der Bezeichnung glyC kartiert. Es wurde gezeigt, dass das als glyC-16 bekannte mutante *E. coli* gegenüber dem Aktivator Fructose-1,6-bisphosphat empfindlicher und gegenüber dem Inhibitor cAMP weniger empfindlich ist (J. Preiss, *Ann. Rev. Microbiol.*, (1984), S. 419–458). Obgleich Pflanzen-AGPs ebenfalls allosterisch sind, reagieren sie auf unterschiedliche Effektormoleküle im Vergleich zu bakteriellen AGPs. In Pflanzen wirkt 3-Phosphoglycerinsäure (3-PGA) als ein Aktivator, während Phosphat (PO_4) als ein Inhibitor dient (Dickinson und Preiss, 1969, a.a.O.).

[0016] Unter Verwendung eines in vivo-Mutagenesesystems, das durch das Ac-vermittelte Ausschneiden eines transponierbaren Ds-Elements, das sich zufällig in der Nähe einer bekannten Aktivator-Bindungsstelle befindet, waren Giroux et al.

[0017] (M. J. Giroux, J. Shaw, G. Barry, G. B. Cobb, T. Greene, T. W. Okita und L. C. Hannah, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Bd. 93 (1996), S. 5824–5829) dazu in der Lage, ortsspezifische Mutanten in einer funktionell wichtigen Region von Mais-Endosperm-AGP zu erzeugen. Eine Mutante, nämlich Rev 6, enthielt ein Tyrosininsert und bedingte eine 11–18%ige Zunahme des Samengewichts.

[0018] WO-91/11520 beschreibt die Verwendung modifizierter Formen von Polynucleotiden, die für AGP mit verbesserter Wärmestabilität kodieren, um die Stärkeausbeute in einer Pflanze, z. B. *Zea mays*, zu verbessern.

[0019] Charing et al., *J. Biol. Chem.*, Bd. 269(39) (1994), S. 24107–24113 beschreibt die Herstellung einer Mutante von Spinatblätter-AGP, die hier als "K419R" bezeichnet wird und bei der nach 5-minütiger Wärmebehandlung bei 60 °C eine höhere Aktivität als beim Wildtypenzym erhalten bleibt.

[0020] Greene et al., *PNAS USA*, Bd. 93 (1996), S. 1509–1513, beschreibt eine Aminosäuremutation, die das Samengewicht erhöht.

Zusammenfassende Darstellung der Erfindung

[0021] Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung umfasst ein Polynucleotid, das für ein mutantes Pflanzen-ADP-Glucose-phosphorylase (AGP)-Polypeptid kodiert, eine Aminosäuremutation in seiner großen Untereinheit und weist im Vergleich zu einem Wildtyp-AGP-Polypeptid eine erhöhte Wärmestabilität auf, wobei die Mutation den Ersatz der Aminosäure, die His-333, Ala-177, Asp-400, Val-454, Arg-104, Thr-460 oder Arg-216 in Mais entspricht, umfasst. Weitere Aspekte der Erfindung betreffen ein Verfahren zur Erhöhung der Wärmestabilität einer Pflanze, transformierte Pflanzen und Pflanzengewebe sowie ein mutantes AGP-Polypeptid.

[0022] Erfindungsgemäß werden wärmestabile Enzyme bereitgestellt, die zur Bildung von Pflanzen mit größerer Toleranz gegenüber höheren Temperaturen verwendet werden können, wodurch der Ernteertrag dieser Pflanzen erhöht werden kann. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der verbesserten Pflanze um eine Getreidepflanze. Zu Getreidepflanzen, auf die die Erfindung Anwendung findet, gehören beispielsweise Mais, Weizen, Reis und Gerste.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0023] **Fig. 1:** Mutanten der großen Untereinheit von wärmestabiler Mais-Endosperm-AGP. Der prozentuale Anteil der AGP-Aktivität, die nach 5-minütiger Wärmebehandlung bei 60 °C erhalten bleibt, ist dargestellt.

[0024] **Fig. 2:** Ausrichtung der Primärsequenz der die HS 33-Mutation umgebenden Region bei den großen Untereinheiten von Mais, Weizen, Gerste und Kartoffel. Konservierte Regionen sind eingerahmt.

[0025] **Fig. 3:** Ausrichtung der Primärsequenz einer die HS 40-Mutation umgebenden Region bei den großen Untereinheiten von Mais, Weizen, Gerste und Kartoffel. Konservierte Regionen sind eingerahmt. Der fett gedruckte Asparaginsäurerest entspricht der allosterischen D413A-Mutante von Kartoffel-LS (T. W. Greene, R. L. Woodbury und T. W. Okita, *Plant Physiol.*, (1996) (im Druck)). Bei der Spinatblatt-AGP-Sequenz handelt es sich um das Aktivatorstellen-2-Peptid, das bei Studien des 3-PGA-Analogen identifiziert wurde (K. Ball und J. Preiss, *J. Biol. Chem.*, Bd. 269 (1994), S. 24706–24711). Der markierte Lysinrest ist in Fettdruck dargestellt.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0026] Die vorliegende Erfindung betrifft neue mutante Polynucleotidmoleküle und die dadurch kodierten Polypeptide, die bei Pflanzen, die unter Hitzestressbedingungen wachsen, einen erhöhten Ertrag bewirken, verglichen mit Pflanzen mit dem Wildtyp-Genotyp. Bei speziellen Ausführungsformen kodieren die erfindungsgemäßen Polynucleotidmoleküle für die Enzymaktivitäten von Endosperm-ADP-Glucose-pyrophosphorylase (AGP) und lösliche Stärke-synthase (SSS). Die mutanten Enzyme verleihen den Samen eine erhöhte Stabilität gegenüber Hitzestressbedingungen während der Samenentwicklung, verglichen mit Wildtyp-Enzymaktivitäten.

[0027] Gemäß einer Ausführungsform kodiert ein erfindungsgemäßes mutantes Polynucleotid für eine große Untereinheit von AGP, die in der Polypeptidsequenz eine Aminosäuresubstitution von Histidin zu Tyrosin aufweist. Diese Substitution tritt am Aminosäurerest Nr. 333 auf, und zwar gemäß der anerkannten Aminosäurenummerierung dieses Proteins (Shaw und Hannah, 1992, a.a.O.). Die Position dieser Substitution kann vom Fachmann leicht identifiziert werden. Eine zweite Mutation, die durch die vorliegende Erfindung beispielhaft belegt wird, ist eine Substitution von Threonin zu Isoleucin in Position Nr. 460 des AGP-Proteins.

[0028] Weitere Mutanten, die eine erhöhte Wärmestabilität verleihen, sind nachstehend in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1

Mutante	Aminosäureaustausch
HS 13	Ala zu Pro in Position 177
HS 14	Asp zu His in Position 400 und Val zu Ile in Position 454
HS 16	Arg zu Thr in Position 104
HS 33	His zu Tyr in Position 333
HS 39	His zu Tyr in Position 333
HS 40	His zu Tyr in Position 333 und Thr zu Ile in Position 460
HS 47	Arg zu Pro in Position 216 und His zu Tyr in Position 333

[0029] cDNA-Klone für die Untereinheiten von Mais-Endosperm-AGP (SH2 und BT2) und der E. coli-Stamm mit Defizit in Bezug auf die endogene bakterielle AGP (glgC⁻) (AC70R1-504) haben die Schaffung eines bakteriellen Expressionssystems zur Untersuchung der Mais-Endosperm-AGP erleichtert. Die Expression einer einzigen Untereinheit ist nicht zur Komplementierung der glgC⁻-Mutante befähigt und es wird kein Glycogen erzeugt (A. Iglesias, G. F. Barry, C. Meyer, L. Bloksberg, P. Nakata, T. Greene, M. J. Laughlin, T. W. Okita, G. M. Kishore und J. Preiss, J. Biol Chem., Bd. 268 (1993), S. 1081–1086). Jedoch komplementiert die Expression sowohl der großen als auch der kleinen Untereinheit an kompatiblen Expressionsvektoren in vollständiger Weise die glgC⁻-Mutation und führt zur Wiederherstellung der Erzeugung von Glycogen, wie sich durch eine dunkle, rotstichig-braune Färbung von mit Iod behandelten Kolonien zeigt. Somit lässt sich die Komplementierung in einfacher Weise identifizieren, indem man die Kolonien mit Iod behandelt.

[0030] Bei einer Ausführungsform wurden E. coli-glgC⁻-Zellen, die die Strukturgene für Kartoffel- oder Mais-Endosperm-AGP exprimieren, verwendet. Zellen mit einem Gehalt an Kartoffel-AGP-Genen können bei Züchtung bei 37 °C oder bei 42 °C große Mengen an Glycogen synthetisieren. Jedoch synthetisieren Zellen, die Mais-Endosperm-AGP exprimieren, Glycogen nur bei 37 °C. Dieses Ergebnis belegt die Wärmeempfindlichkeit von Wildtyp-Mais-Endosperm-AGP. Die Tatsache, dass diesbezüglich ein Unterschied zwischen Kartoffel- und Mais-AGP besteht, stellt ein wirksames System bereit, um mutante Zellen einem Screening zu unterwerfen, die wärmestabile Varianten der Mais-Endosperm-AGP aufweisen. Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft eine wirksame Identifizierung von AGP mit Wärmestabilität. Demgemäß wurde ein Plasmid, das ein für die SH2-Untereinheit von Mais-AGP kodierendes Polynucleotid umfasst, chemisch gemäß den nachstehenden Angaben mutagenisiert, in mutante E. coli-Zellen, die die BT2-Untereinheit exprimieren, platziert und bei 42 °C gezüchtet. Weitere, aus dem Stand der Technik bekannte Mutagene können ebenfalls verwendet werden. Es wurden 11 erbfähige, mit Iod färbende Mutanten isoliert, die als wärmestabile (HS) Mutanten bezeichnet wurden. Rohe Extrakte dieser Mutanten wurden hergestellt und die Wärmestabilität der erhaltenen AGP wurde bestimmt. Die Mutanten behalten nach 5-minütiger Inkubation bei 60 °C 8–59 % ihrer Aktivität ([Fig. 1](#)). Dies steht im Vergleich zu einem Wert von 1–4 %, der routinemäßig für Wildtyp-AGP bei dieser Temperatur festgestellt wird.

[0031] Die Ergebnisse zeigen, dass die wärmestabilen Formen von Enzymen erfindungsgemäß durch Mutation erzeugt werden können. Überraschenderweise wurde bei der Mehrzahl dieser Mutanten die Gesamtaktivität der Mais-Endosperm-AGP, die vor der Wärmebehandlung vorlag, um einen Faktor von etwa 10 erhöht. Dieses überraschende Ergebnis lässt eine besonders vorteilhafte Verwendung dieser Mutanten in der Landwirtschaft zu. Die hier beschriebenen Mutagenesetechniken können erfindungsgemäß herangezogen werden, um andere Gene zu identifizieren, die für wärmestabile Enzyme der Stärkebiosynthese kodieren.

[0032] Die Gene, die für mehrere der wärmestabilen Mutanten, einschließlich die beiden wärmestabilsten RS-Mutanten HS 33 und HS 40, kodieren, wurden vollständig sequenziert. HS 33, bei dem nach Wärmebehandlung 59 % seiner Aktivität erhalten bleiben, enthält eine Mutation eines einzelnen Rasenpaars, die eine Veränderung von Histidin in Position 333 der Aminosäuresequenz des Polypeptids in einen Tyrosinrest bewirkt ([Fig. 2](#)). Primäre Sequenzausrichtungen mit den großen Untereinheiten von Weizen- und Gerste-AGPs zeigen, dass ebenfalls ein Histidin am analogen Rest vorhanden ist ([Fig. 3](#)) (C. Ainsworth, F. Hosein, M. Tarvis, F. Weir, M. Burrell, K. M. Devos, M. D. Gate, Planta, Bd. 197 (1995), S. 1–10). Eine Sequenzanalyse von HS 40, bei dem nach der Wärmebehandlung 41 % seiner Aktivität erhalten bleiben, ergab ebenfalls eine Mutation

von Histidin zu Tyrosin in Position 333. Eine zusätzliche Punktmutation wurde identifiziert, die zu einer Substitution von Threonin zu Isoleucin führt. Der Threoninrest ist in großen AGP-Untereinheiten hochgradig konserviert, während in kleinen AGP-Untereinheiten es sich beim analogen Rest entweder um Cystein oder um Serin handelt (Ainsworth et al., 1995, a.a.O.). Die Substitution von Threonin durch Isoleucin befindet sich nahe am Carboxylterminus der großen Untereinheit und nahe an einer bekannten Bindungsstelle für den Aktivator 3-PGA ([Fig. 3](#)).

[0033] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner wärmostabile Mutanten von AGP, die Mutationen in der kleinen Untereinheit des Enzyms aufweisen. Unter den Umfang der Erfindung fallen auch Polynucleotide, die für die mutanten kleinen Untereinheiten von AGP kodieren. Mutationen in der kleinen Untereinheit von AGP, die dem Enzym Wärmostabilität verleihen, lassen sich ebenfalls leicht unter Anwendung der erfindungsgemäßen Verfahren herstellen und identifizieren.

[0034] Pflanzen und Pflanzengewebe, die so gezüchtet worden sind, dass sie die mutanten Polynucleotide enthalten, oder die in entsprechender Weise transformiert worden sind, und die Polypeptide, für die die Polynucleotide kodieren, exprimieren, kommen ebenfalls erfindungsgemäß in Betracht. Pflanzen und Pflanzengewebe, die die mutanten Polynucleotide exprimieren, erzeugen Gewebe, die beispielsweise einen geringeren wärmeinduzierten Verlust an Gewicht oder Ertrag aufweisen, wenn sie während ihrer Entwicklung einem Hitzestress unterliegen.

[0035] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Verfahren zur Herstellung und Identifizierung von erfindungsgemäßen Polynucleotiden und Polypeptiden. Gemäß einer Ausführungsform kann eine Genmutation unter anschließender Selektion unter Verwendung eines bakteriellen Expressionssystems dazu herangezogen werden, Polynucleotidmoleküle zu isolieren, die für Enzyme kodieren, die eine wärmeinduzierte Einbuße der Stärkesynthese in Pflanzen abmildern können.

[0036] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Pflanzen und Pflanzengewebe, in deren Genom ein mutantes AGP-Gen eingebaut ist. Weitere, hier beschriebene Allelen können ebenfalls in ein Pflanzengenom eingebaut werden. Bei einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Pflanze um eine Getreidepflanze. Insbesondere handelt es sich bei der Pflanze um *Zea mays*. Pflanzen mit einem mutanten AGP-Gen können aus Saatgut gezüchtet werden, das in seinem Genom ein mutantes Gen umfasst. Ferner sind Techniken zur Transformation von Pflanzen mit einem Gen aus dem Stand der Technik bekannt.

[0037] Aufgrund der Degeneration des genetischen Codes kann eine Vielzahl von verschiedenen Polynucleotidsequenzen jeweils für die hier beschriebenen varianten AGP-Polypeptide kodieren. Ferner liegt es im Können des Fachmanns, alternative Polynucleotidsequenzen zu schaffen, die für das gleiche oder im wesentlichen das gleiche erfindungsgemäße Polypeptid kodieren. Diese varianten oder alternativen Polynucleotidsequenzen fallen unter den Umfang der vorliegenden Erfindung. Die hier verwendete Ausdrucksweise "im Wesentlichen die gleiche" Sequenz bezieht sich auf Sequenzen, die für Substitutionen, Deletionen, Additionen oder Insertionen von Aminosäuren kodieren, die nicht in erheblichem Umfang die funktionelle Aktivität des Polypeptids, das durch das hier beschriebene mutante AGP-Polypeptid kodiert wird, verändern.

[0038] Eine Substitution von Aminosäuren, die von den in den hier beschriebenen Mutanten beispielhaft belegten Substitutionen abweichen, fallen ebenfalls unter den Umfang der vorliegenden Erfindung. Aminosäuren lassen sich in die folgenden Klassen einteilen: nichtpolare, ungeladene polare, basische und saure Aminosäuren. Konservative Substitutionen, bei denen ein mutantes AGP-Polypeptid mit einer Aminosäure einer Klasse durch eine andere Aminosäure der gleichen Klasse ersetzt wird, fallen unter den Umfang der vorliegenden Erfindung, sofern das mutante AGP-Polypeptid mit der Substitution noch eine erhöhte Wärmostabilität im Vergleich zum Wildtyp-Polypeptid aufweist. In der nachstehenden Tabelle 2 findet sich eine Aufzählung von Beispielen für Aminosäuren, die in die einzelnen Klassen fallen.

Tabelle 2

Aminosäureklasse	Beispiele für Aminosäuren
Unpolar	Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp
Ungeladen polar	Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln
Sauer	Asp, Glu
Basisch	Lys, Arg, His

[0039] Beispielsweise fällt eine Substitution des Tyrosins in Position 333 in mutantern HS 33-, HS 39-, HS 40- und HS 47-Mais-Endosperm-AGP durch andere Aminosäuren, wie Glycin, Serin, Threonin, Cystein, Asparagin und Glutamin, unter den Umfang der Erfindung.

[0040] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Polynucleotide, die für Fragmente des mutanten Polypeptids von voller Länge kodieren, sofern diese Fragmente im wesentlichen die gleiche funktionelle Aktivität wie das Polypeptid von voller Länge behalten. Die Fragmente von mutantern AGP-Polypeptid, die durch diese Polynucleotide kodiert werden, fallen ebenfalls unter den Umfang der vorliegenden Erfindung.

[0041] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner solche Polynucleotidmoleküle, die Sequenzen aufweisen, die eine ausreichende Homologie zur Wildtyp-Sh2-DNA-Sequenz aufweisen, um eine Hybridisierung mit dieser Sequenz unter üblichen Bedingungen von hoher Stringenz zu ermöglichen. Derartige Hybridisierungsbedingungen sind im Stand der Technik üblich (vergl. beispielsweise T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1989)).

[0042] Die erfindungsgemäßen Polynucleotidmoleküle können zur Transformation von Pflanzen verwendet werden, um das mutante, wärmestabile AGP-Enzym in diesen Pflanzen zu exprimieren. Ferner können die erfindungsgemäßen Polynucleotide zur Expression des rekombinanten varianten AGP-Enzyms verwendet werden. Sie können auch als eine Sonde zum Nachweis von verwandten Enzymen verwendet werden. Die Polynucleotide können auch als DNA-Größenstandards verwendet werden.

[0043] Die erfindungsgemäßen Polynucleotidmoleküle umfassen auch solche Polynucleotide, die für AGP-Enzyme kodieren, die einer Pflanzen zusätzlich zur erhöhten Wärmestabilität ein erhöhtes Samengewicht verleihen. Eine Kombination einer wärmestabilisierenden Mutation, HS, mit einer Mutation, die ein erhöhtes Samengewicht bewirkt, z. B. Rev 6, fällt insbesondere unter die vorliegende Erfindung; vergl. beispielsweise die US-Patente 5 589 618 und 5 650 557.

[0044] Mutationen in den AGP-Untereinheiten, die Wärmestabilität verleihen, können erfindungsgemäß mit gegenüber Phosphat unempfindlichen Mutanten von Mais, z. B. mit der Rev 6-Mutation, kombiniert werden, um die Stabilität der durch Rev 6 kodierten großen Untereinheit zu erhöhen.

[0045] Es ist zu erwarten, dass die enzymatische Aktivität von SSS bei höheren Temperaturen beeinträchtigt wird, wie bei AGP festgestellt wurde. Somit können mutagenisierte Formen von SSS unter erhöhten thermischen Bedingungen (42 °C) exprimiert werden, um wärmestabile Varianten zu isolieren. Diese wärmestabilen, mutagenisierten Formen von SSS stellen weitere Aspekte der vorliegenden Erfindung dar.

[0046] Sämtliche Publikationen und Patente, die hier zitiert werden, werden durch Verweis zum Gegenstand der Beschreibung gemacht.

[0047] Nachstehend finden sich Beispiele, die die Verfahren zur Ausübung der Erfindung erläutern. Diese Beispiele sind nicht als eine Beschränkung anzusehen. Sämtliche Prozentangaben beziehen sich auf das Gewicht und sämtliche Mengenverhältnisse für Lösungsmittelgemische beziehen sich auf das Volumen, sofern nichts anderes angegeben wird.

Beispiel 1

Anwendung einer Mutagenese zur Erzielung von wärmestabilen Varianten von Mais-Endosperm-AGP

[0048] Anfänglich wurde das chemische Mutagen Hydroxylamin-HCl für die willkürliche Mutagenese des Expressionsplasmids der großen Untereinheit verwendet. Hydroxylamin bewirkt eine bevorzugte Hydroxylierung des Aminostickstoffs in der C-4-Position von Cytosin und führt zu einem Übergang von GC zu AT (D. T. Suzuki, A. J. F. Griffith, J. H. Miller und R. C. Lewontin, in Introduction to genetic analysis, Freeman, NY, 4. Aufl. (1989), S. 475–499). Dieses chemische Mutagen wurde wegen seiner hohen Mutationsfrequenz gewählt. Einschränkungen des chemischen Mutagens werden festgestellt. Wenn keine große Vielzahl von genetischen Varianten isoliert wird, kann eine willkürliche Mutagenese auf PCR-Basis durchgeführt werden. Eine PCR-Mutagenese erzeugt ein breiteres Spektrum von Mutationen, die ähnliche Frequenzen von Übergängen und Transversion umfassen und die eine hervorragende Alternative für das chemische Verfahren darstellt. Das von Cadwell und Joyce (R. C. Cadwell und G. F. Joyce, PCR Methods and Applications, Bd. 2 (1992), S. 28–33) beschriebene Verfahren kann für das Verfahren auf PCR-Basis eingehalten werden.

[0049] Da das vollständige Expressionsplasmid für die willkürliche Mutagenese verwendet wird, ist es möglich, dass Mutationen außerhalb der Kodierungsregion auftreten. Obgleich zu erwarten ist, dass derartige Mutationen keinerlei Einfluss auf die Wärmestabilität der Mais-Endosperm-AGP ausüben, kann jede Variante in ein unmutiertes Expressionsplasmid subkloniert werden, bevor eine weitere Charakterisierung auf dem Enzymniveau durchgeführt wird. Expressionsplasmide sowohl der großen als auch der kleinen Untereinheit lassen sich so konstruieren, dass durch einen NcoI/SacI-Verdau die vollständige Kodierungsregion freigesetzt wird. Diese Region kann leicht in ein unmutiertes, NcoI/SacI-verdautes Expressionsplasmid rückkloniert werden.

Beispiel 2

Molekulare Charakterisierung und Analyse von wärmestabilen AGP-Varianten

[0050] Zunächst wurden 11 wärmestabile Varianten der großen Untereinheit von Mais-Endosperm erhalten. Zwei davon wurden vollständig sequenziert. Die Sequenzierung wurde unter Verwendung von DuPont- und ABI-Geräten durchgeführt.

[0051] Die Sequenzdaten lassen sich routinemäßig mit der Progenitor-Wildtypallele vergleichen. Diese Analyse ergibt das Ausmaß der Mannigfaltigkeit von Veränderungen, die die Wärmestabilität bedingen.

[0052] Die beiden sequenzierten HS-Mutanten enthalten den gleichen Austausch von Histidin in Tyrosin in der großen Untereinheit. Durch PCR abgeleitete HS-Mutanten lassen sich rasch einem Screening auf den Austausch von Histidin gegen Tyrosin unterziehen, indem man sich der ortsspezifischen Mutagenese unter Einsatz von Primern, die einen Rückaustausch von Tyrosin in Histidin bewirken, bedient.

Beispiel 3

Expression, Reinigung und kinetische Analyse von genetischen Varianten

[0053] Die Bedingungen für die Expression von Wildtyp-Mais-Endosperm-AGP in *E. coli* wurden vollständig charakterisiert. Die optimalen Wachstums- und Induktionsbedingungen variieren in gewissem Umfang gegenüber den Bedingungen, die für die in *E. coli* exprimierte Kartoffel-AGP veröffentlicht wurden (Iglesias et al., 1993, a.a.O.; Ballicora et al., 1995, a.a.O.). Eine 12- bis 14-stündige Induktion bei Raumtemperatur in Gegenwart von 0,3 mM IPTG und 25 µg/ml Nalidixinsäure ergibt in übereinstimmender Weise hohe Expressions- und Aktivitätsgrade. Eine Zugabe von 30 % Ammoniumsulfat und 10 mM KH_2PO_4 -/ K_2HPO_4 - zum Extraktionspuffer stabilisiert die Mais-AGP im rohen Extrakt.

[0054] Mit Ammoniumsulfat eingeeengtes AGP wird ferner durch hydrophobe Wechselwirkungschromatographie unter Verwendung von Tentakel-C3-Aminopropylmedium (EM Separations), das in einer Pharmacia HR-10/10-Säule gepackt war, gereinigt. Protein bindet an der Säule in einem Puffer mit einem Gehalt an 1 M Ammoniumsulfat. AGP wird von der Säule durch sukzessive Stufengradienten-Waschvorgänge mit Puffer, der 0,75 M, 0,5 M, 0,25 M und 0 M Ammoniumsulfat enthält, eluiert. Wildtyp-Mais-Endosperm-AGP wird typischerweise beim 0,25 M-Waschvorgang eluiert. C3-gereinigte Mais-Endosperm-AGP wird ferner durch Anionenaustauschchromatographie unter Verwendung von Macro-Prep-DEAE (BioRad)-Anionenaustauschmedium, das in eine Pharmacia HR-10/10-Säule gepackt ist, gereinigt. AGP wird mit einem linearen Gradienten von 100–500 mM KCl eluiert, wobei die Elution typischerweise bei einer Salzkonzentration um 300 mM erfolgt. Ein Pharmacia FPLC-System wird für sämtliche Chromatographiestufen verwendet. Die Bedingungen für die individuellen Reinigungsstufen werden vollständig charakterisiert. Die AGP-Aktivität während der Reinigung wird durch den Pyrophosphorylysis-Test überwacht. Die Reinigungsstufen werden durch SDS-PAGE, Coomassie-Färbung und Western-Analyse unter Verwendung von polyklonalen Antikörpern, die für die großen und kleinen Untereinheiten von Mais-Endosperm-AGP-spezifisch sind, überwacht.

Beispiel 4

Verstärkte Untereinheit-Wechselwirkung

[0055] Ein völlig unerwarteter pleiotroper Effekt der HS-Mais-Endosperm-AGP-Mutanten besteht in einer 2-fachen Steigerung der vor der Wärmebehandlung gegebenen Aktivität. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis besteht darin, dass wir durch die Mutationsänderung das Verhältnis von SH2- und BT2-Monomeren und -Polymeren, das innerhalb der *E. coli*-Zelle vorliegt, verschoben haben. Möglicherweise existieren im Wild-

typ nur 10 % oder weniger der gesamten Proteine in der aktiven heterotetrameren Form, während in den Mutanten dieser prozentuale Anteil wesentlich höher ist. Wenn das Polymere wärmebeständiger als die Monomeren sind, ist der Phänotyp der Mutanten identisch mit dem, was beobachtet wird. Eine kinetische Analyse kann dazu herangezogen werden, die Veränderungen der Affinitäten für Substrate und/oder allosterische Effektoren zu bestimmen.

[0056] Um die Vorstellung, dass das Monomer/Polymer-Verhältnis in diesen Mutanten verändert ist, zu testen, lassen sich die Mengen an Monomeren und Polymeren im Wildtyp und in ausgewählten Mutanten vor und nach der Wärmebehandlung bestimmen. Die Verfügbarkeit von Antikörpern (M. J. Giroux und L. C. Hannah, Mol. Gen. Genetics, Bd. 243 (1994), S. 400–408) für beide Untereinheiten macht diesen Weg durchführbar. Eine Prüfung kann sowohl durch Saccharosegradienten-Ultrazentrifugation als auch durch Gelchromatographie erfolgen und lässt leicht die Ermittlung des wirksamsten und endgültig einzuschlagenden Verfahrens zu.

[0057] Da AGP von höheren Pflanzen aus zwei ähnlichen, aber doch unterschiedlichen Untereinheiten besteht, die unter Bildung der nativen, heterotetrameren Struktur oligomerisieren, können Mutationen, die diese Wechselwirkung verstärken, dem Enzym eine zusätzliche Stabilität verleihen. Ein Hefe-Doppelhybrid-System (CLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA) kann zur Bewertung von Untereinheit-Wechselwirkungen verwendet werden. Spezifische Primer für die Amplifikation der Kodierungsregionen lassen sich konstruieren. Diese Primer addieren einzigartige Restriktionsstellen an die 5'- und 3'-Enden, so dass die Klonierung die translationale Fusion der individuellen Untereinheit mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne (pGBT9) oder der GAL4-Aktivierungsdomäne (pGAD424) erleichtert. Wenn die in die Vektoren klonierten Proteine in Wechselwirkung treten, bilden die DNA-Bindungsdomäne und die Aktivierungsdomäne einen funktionellen Transkriptionsaktivator. Dies führt wiederum zur Aktivierung der Expression des Reportergens lacZ, das hinter einem GAL4-Promotor kloniert ist.

[0058] Zunächst lassen sich die Bedingungen mit den Wildtyp-Untereinheiten charakterisieren. Die Kodierungsregion der großen und kleinen Untereinheiten des Wildtyps lassen sich in die pGBT9- und pGAD424-Hefeexpressionsvektoren klonieren. Sämtliche möglichen Kombinationen lassen sich erzeugen und testen. pGBT9- und pGAD424-Vektoren mit einem Gehalt an Sh2 und Bt2 lassen sich in den gleichen Hefestamm co-transformieren und einer Selektion in Bezug auf Wachstum auf einem Medium mit einem Mangel an Tryptophan (pGBT9) und Leucin (pGAD424) unterziehen. Die Untereinheit-Wechselwirkung als eine Funktion der lacZ-Expression lässt sich auf zweierlei Weise nachweisen. Positive Kolonien werden durch einen β -Galactosidase-Filtertest visuell identifiziert. Bei diesem Test werden Kolonien an den Filter gebunden, lysiert und mit einer X-gal-Lösung inkubiert. Kolonien, die eine blaue Färbung aufweisen, lassen sich analysieren. Die Untereinheit-Wechselwirkung kann ferner durch einen für β -Galactosidase spezifischen Enzymtest analysiert werden. Dies ermöglicht die quantitative Bestimmung der Wechselwirkung. Mutationen, die Untereinheit-Wechselwirkungen verstärken, ergeben beim Test höhere Werte der β -Galactosidase-Aktivität.

Beispiel 5

Weitere Verstärkung der Stabilität

[0059] Die isolierten Mutanten der großen Untereinheit variieren bezüglich ihrer Wärmestabilitätseigenschaften, was auf die Möglichkeit von mehrfachen Mutationen schließen lässt. Während die Sequenzanalyse der Mutanten HS 33 und HS 40 ergibt, dass die mutanten Sequenzen nicht identisch sind, enthielten beide Mutanten den identischen Austausch von Histidin durch Tyrosin. Aufgrund der Identifizierung von verschiedenen HS-Veränderungen innerhalb des SH2-Proteins ist es möglich, in wirksamer Weise diese Veränderungen pyramidenförmig in einem Protein vorzunehmen. Ferner können beliebige HS-Mutationen innerhalb der kleinen Untereinheit mit HS-SH2-Mutanten coexprimiert werden, um die Stabilität des Mais-Endosperm-Enzyms weiter zu erhöhen.

[0060] Multiple HS-Mutanten innerhalb einer Untereinheit lassen sich leicht kombinieren. Beispielsweise können verschiedene einzigartige Restriktionsstellen, die die Kodierungsregion von Sh2 in drei getrennte Fragmente unterteilen, verwendet werden. Gegebenenfalls können Mutationskombinationen durch Subklonieren des entsprechenden Fragments mit einem Gehalt an der addierten Mutation erzeugt werden. Wenn sich zwei Mutationen in enger Nachbarschaft befinden, kann man sich der ortsgerichteten Mutagenese bedienen, um derartige Kombinationen zu konstruieren. Ein Verfahren für ortsspezifische Mutationen beinhaltet PCR, mutagene Primer und die Verwendung von DpnI-Restriktionsendonuclease. Primer lassen sich so konstruieren, dass sie die Mutation am 5'-Ende enthalten, und zur PCR-Amplifikation unter Verwendung der korrekturlesenden Polymerase Vent verwenden. Amplifizierte DNA kann sodann mit DpnI verdaut werden. Parentale DNA,

die aus *E. coli* isoliert worden ist, wird methyliert und ist somit empfindlich gegen DpnI. Verdaut DNA wird der Größenfraktionierung durch Gelelektrophorese, der Ligation und der Klonierung in die Expressionsvektoren unterzogen. Mutationen werden durch Sequenzanalyse bestätigt und in den AC70R1-504-Stamm, der die kleine Wildtyp-Untereinheit trägt, transformiert. Kombinationsmutanten lassen sich sodann analysieren.

Beispiel 6

Kombination von Wärmestabilitätsmutationen mit Rev6

[0061] Erfindungsgemäß lassen sich die wärmestabilen Mutationen mit einer Mutation kombinieren, die mit einem erhöhten Samengewicht verbunden ist, beispielsweise mit der Rev6-Mutation. Das Ziel besteht darin, die erwünschte, für Rev6 charakteristische Unempfindlichkeit gegen Phosphat beizubehalten, während die Stabilität erhöht wird. Rev 6/HS-Doppelmutanten lassen sich gemäß den hier gemachten Angaben konstruieren und bestätigen. Doppelmutanten lassen sich in AC70R1-504, das die kleine Wildtyp-Untereinheit trägt, transformieren. Eine erhöhte Wärmestabilität lässt sich leicht durch eine positive Glycogenfärbung auf Medien mit geringem Glucosegehalt identifizieren. Rev6 ergibt bei Züchtung auf diesem Medium keine Färbung. Zunächst lassen sich sämtliche Mutantenkombinationen enzymatisch einem Screening auf die Beibehaltung der Phosphat-Unempfindlichkeit unterziehen. Nur Kombinationen, bei denen die Phosphat-Unempfindlichkeit erhalten bleibt, werden weiter analysiert.

Beispiel 7

Klonierung von SSS I-Mutanten

[0062] Ein *gig A*⁻-*E. coli*-Stamm mit einem Mangel an endogener bakterieller Glycogen-synthase kann vom *E. coli*-Stock Center bezogen werden. Bakterielle Expressionsvektoren die derzeit für die Expression von AGP verwendet werden, lassen sich für die Expression von SSS einsetzen.

[0063] Eine Klonierungsstrategie, die beispielsweise bei Sh2 und Bt2 eingesetzt wird (Giroux et al., 1996, a.a.O.), wird nachstehend angegeben. Ein Primer enthält eine einzigartige Restriktionsstelle plus den 5'-Terminus des Transkripts, während der andere Primer eine weitere einzigartige Restriktionsstelle und Sequenzen in 3'-Stellung zum translationalen Terminationscodon des zu untersuchenden Gens enthält. Eine anschließende Klonierung dieser Primer führt zu einer translationalen Fusion innerhalb des Plasmids. Diese genspezifischen Primer werden anfänglich bei RT-PCR-Reaktionen unter Verwendung von Poly A+RNA als sich entwickelnden Endospermien verwendet.

[0064] Die Expression von Mais-Endosperm-SSS I bewirkt eine Komplementierung des Mangels an Glycogen-synthase-Aktivität im *gig A*⁻-Stamm. Die Komplementierung sollte sich leicht durch Iodfärbung sichtbar machen lassen, wie es bei der Expression von AGP im *gig C*⁻-Stamm der Fall ist. Rohe Extrakte lassen sich bei verschiedenen Temperaturen und für unterschiedliche Zeitspannen inkubieren, um die Wärmestabilität von SSS I zu bestimmen. Der *gig A*⁻-Stamm, der das Mais-Endosperm-SSS I exprimiert, kann bei verschiedenen Temperaturen gezüchtet werden, um festzustellen, ob die Funktion temperaturempfindlich ist, wie es beim bakteriellen AGP-Expressionssystem der Fall ist. Nachdem eine restriktive Temperatur festgestellt worden ist, kann eine willkürliche Mutagenese mit dem SSS I-Klon durchgeführt werden. Mutante Formen von SSS I lassen sich in den *gig A*⁻-Stamm transformieren und bei der restriktiven Temperatur züchten. Wärmestabile Varianten lassen sich aufgrund ihrer Fähigkeit zur Bildung von durch Iod gefärbtem Glycogen bei der Restriktionstemperatur identifizieren.

Patentansprüche

1. Polynucleotid, kodierend für ein mutantes Pflanzen-ADP-Glucosephosphorylase (AGP)-Polypeptid, das eine Aminosäuremutation in seiner großen Untereinheit umfasst und das im Vergleich zu einem Wildtyp AGP-Polypeptid eine erhöhte Wärmestabilität aufweist, wobei die Mutation den Ersatz der Aminosäure, die His-333, Ala-177, Asp-400, Val-454, Arg-104, Thr-460 oder Arg-216 in Mais entspricht, umfasst.

2. Polynucleotid nach Anspruch 1, wobei es sich beim mutanten Polypeptid um Mais-Endosperm-AGP handelt.

3. Polynucleotid nach Anspruch 1 oder 2, wobei beim mutanten Polypeptid 8–59 % seiner Aktivität erhalten bleiben, wenn es in *E. coli*-Zellen, die die BT2-Untereinheit exprimieren, platziert wird und eine 5-minütige

Züchtung bei 60 °C vorgenommen wird.

4. Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Mutation den Ersatz von His-333 umfasst.
5. Polynucleotid nach Anspruch 4, wobei es sich bei der Ersatzamino­säure um Tyr handelt.
6. Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Mutation den Ersatz von Ala-177 umfasst.
7. Polynucleotid nach Anspruch 6, wobei es sich bei der Ersatzamino­säure um Pro handelt.
8. Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Mutation den Ersatz von Asp-400 umfasst.
9. Polynucleotid nach Anspruch 8, wobei es sich bei der Ersatzamino­säure um His handelt.
10. Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Mutation den Ersatz von Val-454 umfasst.
11. Polynucleotid nach Anspruch 10, wobei es sich bei der Ersatzamino­säure um Ile handelt.
12. Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Mutation den Ersatz von Arg-104 umfasst.
13. Polynucleotid nach Anspruch 12, wobei es sich bei der Ersatzamino­säure um Thr handelt.
14. Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Mutation den Ersatz von Thr-460 umfasst.
15. Polynucleotid nach Anspruch 14, wobei es sich bei der Ersatzamino­säure um Ile handelt.
16. Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Mutation den Ersatz von Arg-216 umfasst.
17. Polynucleotid nach Anspruch 16, wobei es sich bei der Ersatzamino­säure um Pro handelt.
18. Polynucleotid nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das mutante Polypeptid ferner eine Rev6-Mutation umfasst, die einer das Polynucleotid exprimierenden Pflanze ein erhöhtes Samengewicht verleiht.
19. Verfahren zur Erhöhung der Wärmebeständigkeit einer Pflanze, das das Einverleiben eines Polynucleotids nach einem der vorstehenden Ansprüche in das Genom der Pflanze und die Expression des dadurch kodierten Proteins umfasst.
20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei es sich bei der Pflanze um eine Getreidepflanze handelt.
21. Verfahren nach Anspruch 19, wobei es sich beim Getreide um Mais, Weizen, Reis oder Gerste handelt.
22. Verfahren nach Anspruch 19, wobei es sich bei der Pflanze um Zea mays handelt.
23. Pflanze, die das mutante AGP-Polypeptid gemäß der Definition in einem der Ansprüche 1 bis 18 exprimiert.
24. Pflanze nach Anspruch 23, bei der es sich um eine Getreidepflanze handelt.
25. Pflanze nach Anspruch 24, wobei es sich bei dem Getreide um Mais, Weizen, Reis oder Gerste handelt.
26. Pflanze nach Anspruch 23, wobei es sich bei der Pflanze um Zea mays handelt.
27. Pflanzengewebe, dessen Genom die Sequenz eines Polynucleotids nach einem der Ansprüche 1 bis 18 umfasst.
28. Pflanzengewebe nach Anspruch 27, wobei es sich bei der Pflanze um eine Getreidepflanze handelt.
29. Pflanzengewebe nach Anspruch 28, wobei es sich bei dem Getreide um Mais, Weizen, Reis oder Gers-

te handelt.

30. Pflanzengewebe nach Anspruch 27, wobei es sich bei der Pflanze um *Zea mays* handelt.

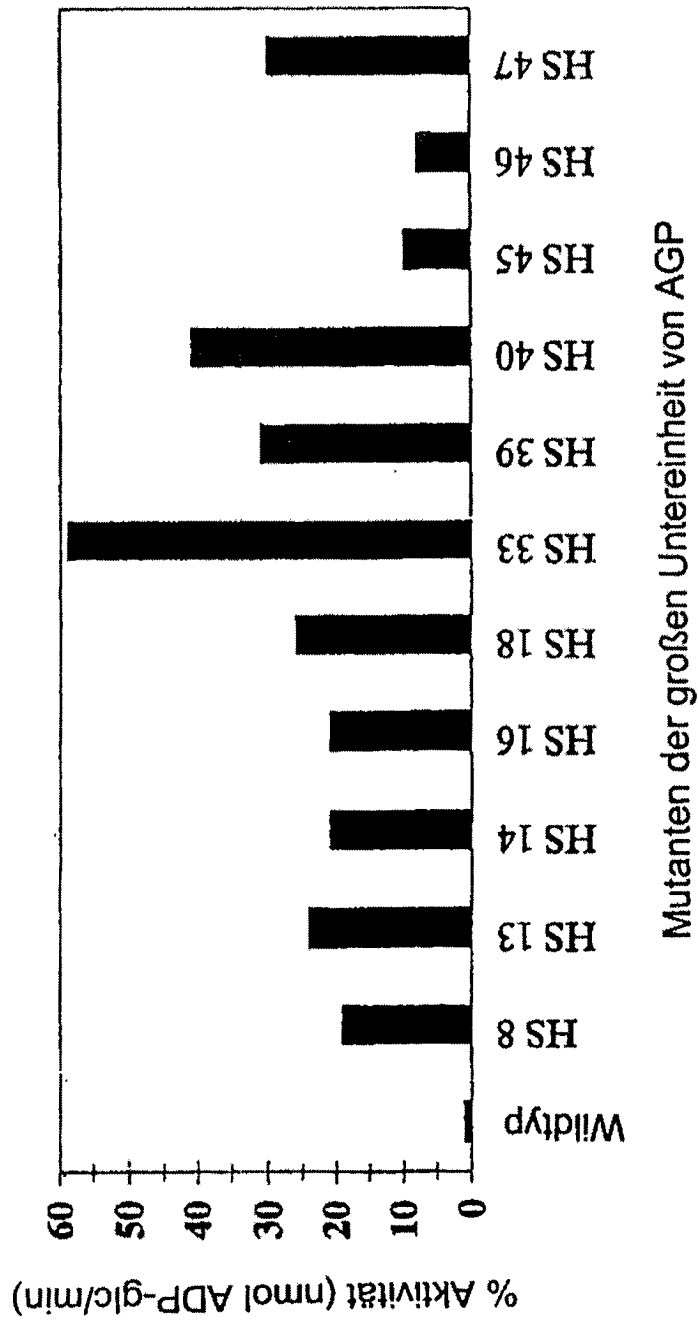
31. Pflanzengewebe nach einem der Ansprüche 27 bis 30, bei dem es sich um einen Samen handelt.

32. Mutantes Pflanzen-ADP-Glucose-phosphorylase (AGP)-Polypeptid, das eine Aminosäuremutation in seiner großen Untereinheit umfasst und das im Vergleich zu einem Wildtyp AGP-Polypeptid eine erhöhte Wärmestabilität aufweist, wobei die Mutation den Ersatz der Aminosäure, die His-333, Ala-177, Asp-400, Val-454, Arg-104, Thr-460 oder Arg-216 in Mais entspricht, umfasst.

33. Polypeptid nach Anspruch 32, das der Definition in einem der Ansprüche 2 bis 18 entspricht.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



Figur 1

HS 40	A	G	K	V	P	I	G	I	G	R	N	T	K	I	R	N	C	I	I	D	M	N	A	R	I	G
Mais-LS	E	G	K	V	P	I	G	V	G	E	N	T	K	I	S	N	C	I	I	D	M	N	A	R	I	G
Weizen-LS	E	G	K	V	P	I	G	V	G	E	N	T	K	I	S	N	C	I	I	D	M	N	A	R	I	G
Kartoffel-LS	E	G	K	V	P	I	G	I	G	E	N	T	K	I	R	K	C	I	I	D	K	N	A	K	I	G
Spinat-LS																										

Figur 3