



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 35 580 T2 2007.02.01**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 877 754 B1**

(51) Int Cl.⁸: **C07K 14/00 (2006.01)**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 35 580.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/FR97/00167**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 901 688.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1997/028247**

(86) PCT-Anmeldetag: **28.01.1997**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **07.08.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **18.11.1998**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **29.03.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **01.02.2007**

(30) Unionspriorität:
9601004 29.01.1996 FR

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

(73) Patentinhaber:
Biogemma, Paris, FR

(72) Erfinder:
**LUDEVID, Centro de Investigacion y, Dolorès,
E-08034 Barcelone, ES; TORRENT, Centro de
Investigacion y, Margarita, E-08034 Barcelone, ES;
ALVAREZ, Centro de Investigacion y, Inaki,
E-08034 Barcelone, ES; PEREZ, Pascual, F-63110
Beaumont, FR**

(74) Vertreter:
derzeit kein Vertreter bestellt

(54) Bezeichnung: **AN AMINOSAEURE ANGEREICHETERTE SPEICHERPROTEINE, INSBESONDERE AN LYSIN ANGE-
REICHETERTE MAIS-GAMMA-ZEINE, UND DIESE EXPRIMIERENDE PFLANZEN**

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

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

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Übersetzung betrifft neue Mittel zur Herstellung von Pflanzen, die Speicherproteine exprimieren, die an Aminosäuren angereichert sind, welche in den normalen Speicherproteinen nur in ungenügenden Mengen vorkommen, insbesondere an Lysin angereicherte Speicherproteine. Außerdem betrifft die Erfindung die so modifizierten Speicherproteine sowie Pflanzen, die diese modifizierten Speicherproteine exprimieren. Unter diesen Speicherproteinen betrifft die Erfindung Speicherproteine aus der Familie der Zeine.

[0002] Zahlreiche Pflanzen, gegebenenfalls nach Transformation mittels chemisch-physikalischer Schritte, sind ökonomisch sehr wichtig für die menschliche oder tierische Ernährung, und das Problem der Verbesserung ihrer ernährungsphysiologischen Eigenschaft hat bereits zu Forschung verschiedener Art geführt. Insbesondere hat man, um dem Problem des Mangels an gewissen Aminosäuren in den Speicherproteinen der Pflanzen zu begegnen, ausgewählte Sorten produziert, die eine verbesserte ernährungsphysiologische Eigenschaft aufweisen, bzw. wurden unterschiedliche Modifikationen vorgeschlagen, bei denen gentechnische Methoden verwendet werden, um die Produktion von insbesondere gewissen Aminosäuren, die in ungenügenden Mengen vorkommen, jedoch für die ernährungsphysiologischen Eigenschaften der Pflanze wichtig sind, zu begünstigen oder zu erhöhen. Bei diesen Aminosäuren, die in ungenügenden Mengen vorkommen, handelt es sich zum Beispiel um Lysin oder Methionin.

[0003] Im Rahmen der vorliegenden Anmeldung haben die Erfinder vorgeschlagen, dem Problem der züchterischen Verbesserung von Pflanzen, insbesondere der züchterischen Verbesserung ihrer ernährungsphysiologischen Eigenschaften, mit einer neuen Lösung zu begegnen, wobei man sich auf eine ökonomisch hteige Pflanze, nämlich den Mais, konzentriert hat. Genauer gesagt hat man sich für die Speicherproteine des Endosperms der Maissamen interessiert, also für Proteine, die insbesondere Zeine, ganz besonders γ -Zeine, umfassen.

[0004] Während der Entwicklung der Maissamen synthetisieren die Endospermzellen Speicherproteine in großen Mengen, insbesondere α -, β - und γ -Zeine. Diese Zeine werden in den vom endoplasmatischen Retikulum (ER) stammenden Proteinkörpern angereichert.

[0005] Allgemein stellen die Zeine eine komplexe Gruppe von Proteinen dar, die in mehrere Gruppen, nämlich die α -, β - und γ -Zeine eingeteilt werden (Larkins et al., 1989) und von einer Multigen-Familie codiert werden (Hagen und Rubenstein, 1980, Gene 13, 239–249). Obwohl ihre Struktur variiert, sind diesen Proteinen gewisse Merkmale gemeinsam, nämlich das Vorliegen von in Tandemanordnung wiederholten Sequenzen, die reich an prolinartigen Aminosäureresten sind, in ihrer Primärstruktur, das Vorhandensein von zahlreichen hydrophoben Resten, die die Unlöslichkeit dieser Proteine in wäßrigen Medien vermitteln, und das Fehlen von Lysinresten, die essentielle Aminosäuren für den Menschen und Monogastrier sind. Das Fehlen von Lysin in allen Hauptproteinen (die in hohen Mengen im Endosperm nachgewiesen werden), die natürlich von der Familie der Zeine gebildet werden, führt zu einer sehr unausgewogenen Aminosäurezusammensetzung in Maissamen.

[0006] Unter diesen Proteinen ist das Mais- γ -Zeine ein Protein mit einem Molekulargewicht von 28 kDa, dessen Codiersequenz in Form der cDNA von Prat et al. (Nucleic Acids Research, Bd. 13, Nr. 5, 1985, S. 1494–1504) beschrieben wurde. Die vollständige Sequenz des Gens, das für das γ -Zeine codiert, inklusive der nichtcodierenden Sequenzen stromaufwärts und stromabwärts mit den Expressionsregulationselementen wurde von Reina, M. et al. (Nucleic Acids Research, Bd. 18, Nr. 21, 1990, S. 6426) beschrieben.

[0007] Für die Erhöhung des Lysingehalts von Proteinen der Zeine-Familie hat man bis jetzt verschiedene Ansätze ins Auge gefaßt. Es wurden genetische und molekulare Ansätze verwendet. So wurden zum Beispiel Mutanten, mit denen lysinreicher Mais erhalten werden kann, wie die Mutante Opaque-2 (o2) und die Mutante floury-2 (fl-2) (Mertz et al., 1964, Science 145, 279–280, Nelson et al., 1965, Science 150, 1469–1470) vorgeschlagen und es wurden erste Versuche unternommen, um den negativen Auswirkungen des Fehlens von gewissen Zeinklassen, insbesondere der α -Zeine, auf die phenotypischen Eigenschaften entgegenzuwirken, und zwar durch Selektion von Mais, der o2-modifizierende Gene enthält (Paez et al., 1969, Plant Sci. 9, 251–252, Geetha et al., 1991, Plant Cell 3, 1207–1219).

[0008] Ein anderer Ansatz besteht darin, daß man direkt auf die Produktion von freiem Lysin einwirkt, insbesondere bei zweikeimblättrigen Pflanzen. Diese Technik wurde so bewerkstelligt, daß man auf die Deregelation von Schlüsselenzymen (DHAPS und AK), die über die Asparaginsäure am Lysin-Biosyntheszyklus beteiligt sind, eingewirkt hat. Bei Versuchen zur Transformation von Tabakpflanzen mit E. coli-Bakterien, die die dapA-Gene enthalten, sowie E. coli-Bakterien, die das lysC-Gen enthalten, wurde ein beträchtlicher Anstieg des

Gehalts an freiem Lysin in den Blättern, jedoch nicht in den Samen, erzielt (Shaul und Galili, 1992, Plant J. 2, 203–209 und 1993, Plant Mol. Biol. 23, 759–768; Perl, A., Schaul O., Galili, G., 1992, Plant Molecular Biology, 19, S. 815–823). In jüngster Zeit wurden dieselben Gene, *dapA* von *Corynebacterium* sowie *lysC* von *E. coli*, verwendet und unter der Kontrolle eines samenspezifischen Promotors in Sojapflanzen exprimiert. Die Expression dieser beiden Enzyme in Soja hat zu einer fünffachen Erhöhung des Lysingehalts in den Samen geführt (Falco et al., 1995, BIO-Technology 13, 577–582).

[0009] Andere Autoren (Wallace et al., 1988, Science 240, 662–664) haben versucht, den Lysingehalt von α -Zein (19 kDa) von Maissamen dadurch zu erhöhen, daß sie punktuell Lysinreste in unterschiedlichen Positionen in das α -Zein-Molekül eingeführt haben. Die Expression dieser Konstrukte in *Xenopus*-Oocyten hat zu einer korrekten Assemblierung von lysinreichen Zeinen in den Vesikeln, die den Proteinkörpern entsprechen, geführt. Bei ihrer Exprimierung in Tabaksamen wurden jedoch das normale α -Zein sowie die modifizierte, lysinangereicherte Form abgebaut (Othani et al., 1991, Plant Mol. Biol. 16:117).

[0010] Es war also damals noch nichts über Mittel bekannt, mit denen die Expression eines mit Lysin angereicherten Zeins in den Zein auf natürliche Weise produzierenden Zellen in Mais, also in den Endospermzellen, ermöglicht werden könnte; ganz zu schweigen von der Expression von mit Lysin angereicherten Zeinen in anderen Pflanzenzellen.

[0011] Eines der Ziele der vorliegenden Erfindung ist daher die Bereitstellung von Mitteln, mit denen ein an Lysin angereichertes Zein, insbesondere ein an Lysin angereichertes Mais- γ -Zein, erhalten werden kann, wobei dieses Protein insbesondere in Mais-Samenzellen und ganz besonders in den Endospermzellen exprimiert wird und wobei das modifizierte Protein weiterhin so exprimiert wird, daß seine Eigenschaften bezüglich der Lokalisation und Akkumulation beim endoplasmatischen Reticulum und davon stammenden Proteinkörpern erhalten bleiben.

[0012] Im Zusammenhang mit der vorliegenden Anmeldung bedeutet der Ausdruck "an Lysin angereichert" daß das Protein eine im Vergleich zu dem natürlichen Protein, von dem es abstammt, eine erhöhte Anzahl Lysinreste aufweist, zum Beispiel aufgrund einer Modifikation der Nukleotidsequenz, die es exprimiert.

[0013] Außerdem werden in der Erfindung Mittel zur Erzielung der Expression von Proteinen, vorzugsweise von an Lysin angereicherten γ -Zeinen, in Pflanzenzellen von verschiedenen Geweben, zum Beispiel von Blattgeweben oder Wurzelgeweben, sowie gegebenenfalls in Pflanzenzellen von Pflanzen, die das Protein, insbesondere das γ -Zein, nach dessen Produktion man trachtet, nicht auf natürliche Weise exprimieren, vorgeschlagen.

[0014] Gemäß einer besonderen Ausführungsform der Erfindung können außerdem andere Speicherproteine auf analoge Art und Weise mit Lysin angereichert werden, ganz besonders Speicherproteine der Familie der Zeine.

[0015] Zur Durchführung der Erfindung haben die Erfinder erstens vorgeschlagen, Sequenzen, die für an Lysin angereicherte Polypeptide codieren, in das Gen, das für das γ -Zein oder für andere Speicherproteine von Mais oder anderen Pflanzen codiert, bzw. in die Sequenz, die dieses Gen codiert, einzuführen, um zur Produktion von an Lysin angereicherten γ -Zeinen oder anderen Proteinen und damit zu an Lysin angereicherten Samen zu gelangen. Für die Herstellung von so modifizierten Nukleotidsequenzen wurden unterschiedliche Stellen der Sequenz, die für das γ -Zein-Gen codiert, als permissive Stellen (auch "neutrale Stellen" genannt) identifiziert.

[0016] In der vorliegenden Anmeldung werden daher Mittel für die Transformation des Gens, das für das Mais- γ -Zein codiert, oder für die Transformation jeglicher Nukleotidsequenz, die für das γ -Zein codiert und von diesem Gen abgeleitet ist, vorgeschlagen, um ausgehend von der Expression des modifizierten Gens oder allgemeiner ausgedrückt der modifizierten Nukleotidsequenz zu einem an Lysin angereicherten Protein zu gelangen; zu diesen Mitteln zählen insbesondere synthetische Oligonukleotide, die für eine Sequenz von Aminosäuren mit Lysinresten codieren.

[0017] Die Erfindung betrifft auch rekombinante Nukleotidsequenzen oder chimäre Sequenzen, die für ein an Lysin angereichertes γ -Zein codieren können.

[0018] Ebenfalls vom Rahmen der Erfindung umfaßt sind Wirtszellen, die mit solchen Sequenzen transformiert sind, insbesondere Pflanzenzellen, zum Beispiel Zellen, aus denen Pflanzen regeneriert werden können,

sowie Pflanzen oder Pflanzenteile (Gewebe, Organe usw.), die solche Zellen enthalten und die auf stabile Art und Weise modifizierte Speicherproteine, insbesondere an Lysin angereicherte γ -Zeine, produzieren.

[0019] Die Erfindung betrifft weiterhin solche modifizierten Proteine, zum Beispiel an Lysin angereicherte Proteine, sowie Antikörper gegen diese Proteine, ganz besonders an Lysin angereicherte Speicherproteine der Familie der Zeine.

[0020] Ein geeignetes Oligonukleotid für die Durchführung der Erfindung, das für die Herstellung von rekombinanten Nukleotidsequenzen verwendet werden kann, ist dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens eine Verknüpfung umfaßt, die für ein Polypeptid der Formel $(P - K)_n$, in der:

- n eine ganze Zahl 2 oder darüber bedeutet,
- P einen Prolin-Aminosäurerest darstellt,
- K einen Lysin-Aminosäurerest darstellt,

das Zeichen „-“ eine Bindung zwischen den beiden Aminosäureresten, insbesondere eine peptidartige Bindung, symbolisiert, wobei die n Einheiten $(P - K)$ untereinander ebenfalls durch solche Bindungen, zum Beispiel peptidartige Bindungen, gebunden sind, codiert.

[0021] Ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid ist daher in einer ersten Ausführungsform dadurch gekennzeichnet, daß es eine Sequenz umfaßt, die für eine Abfolge von Motivwiederholungen, die zwei Aminosäuren umfassen, codiert.

[0022] Die Oligonukleotid-Codons können für alle Prolinreste und/oder für alle Lysinreste identisch sein. Sie können entsprechend dem degenerierten genetischen Code auch für ein- und denselben Aminosäurerest verschieden sein.

[0023] Vorzugsweise wird dieses Oligonukleotid von einer Sequenz gebildet, die für mehr als zwei Einheiten $(P - K)$ codiert. Vorzugsweise ist n 30 oder darunter, insbesondere unter 20, und vorteilhafterweise gleich 4, 5, 6, 7, 8, 9 oder 10 oder 15.

[0024] Die erfindungsgemäßen "Oligonukleotide" können chemisch auf jede verfügbare Art und Weise synthetisiert werden.

[0025] Der Ausdruck "Polypeptid", der sich auf die Verknüpfung $(P - K)_n$ bezieht, bezeichnet im Zusammenhang mit der vorliegenden Anmeldung eine Aminosäuresequenz mit mehr als 2 Aminosäureresten, die bis zu 60 Aminosäurereste umfassen kann.

[0026] Gemäß einer ersten Ausführungsform der Erfindung umfaßt das Oligonukleotid mehrere Verkettungen, die für ein Polypeptid der Formel $(P - K)_n$ codieren, die gleich oder verschieden sind und die in Tandemordnung angeordnet sind.

[0027] Bei diesen Oligonukleotiden handelt es sich entweder um Wiederholungen von ein- und derselben Verknüpfung oder um Assoziationen von unterschiedlichen Verknüpfungen. Die Anzahl der beteiligten Verknüpfungen schwankt und kann zum Beispiel zwischen 2 und 10 Verknüpfungen betragen.

[0028] Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist das oben definierte Oligonukleotid dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens eine Verknüpfung umfaßt, die für ein Polypeptid der Formel $(P - K)_n$ codiert, in der die Sequenz der n Einheiten $(P - K)$ durch einen oder mehrere Aminosäurereste, die von den Resten P oder K verschieden sind, unterbrochen ist.

[0029] Vorzugsweise werden die zusätzlichen Aminosäuren, die in die von den Einheiten $(P - K)$ gebildete Sequenz eingebaut werden, so ausgewählt, daß sie den Aufbau des von dem Oligonukleotid codierten Polypeptids nicht modifizieren oder zumindest so, daß sie unter den Bedingungen, die die Struktur und/oder Funktion und/oder Lokalisierung dieses Proteins beeinflussen würden, keine Wechselwirkung zwischen den Aminosäuren eines Proteins, in das dieses Polypeptid eingebaut werden soll, hervorrufen.

[0030] Dies kann insbesondere dann der Fall sein, wenn die Anzahl der Einheiten $(P - K)$ hoch ist oder wenn mehrere Verkettungen, die aus Sequenzen, die für Motive $(P - K)_n$ codieren, gebildet werden, in Tandemordnung angeordnet sind und wenn die Herstellung des entsprechenden Oligonukleotids es erforderlich macht, daß mehrere Nukleotidsequenzen synthetisiert werden, die anschließend zum Beispiel mittels Linker zusam-

mengefügt werden.

[0031] Gemäß einer anderen Ausführungsform der Erfindung ist das Oligonukleotid dergestalt, daß die Verkettung, die für das Polypeptid mit den n Einheiten (P – K) codiert, an seinem 5'- und/oder 3'-Ende durch ein oder mehrere Codons vervollständigt ist, die zum Beispiel für mindestens einen Lysinrest am N-terminalen Ende des Polypeptids codieren.

[0032] Beispielsweise ist ein bevorzugtes erfindungsgemäßes Oligonukleotid dadurch gekennzeichnet, daß es für ein Polypeptid der Formel $(P - K)_n$, der Formel $K(P - K)_4$ oder der Formel $2K(P - K)_4$ entspricht.

[0033] Gemäß einer besonderen Ausführungsform entspricht die Zusammensetzung dieses Oligonukleotids einer der auf den folgenden Seiten beschriebenen Sequenzen mit der Bezeichnung SEQ ID No:1 und SEQ ID No:2.

[0034] Die oben beschriebenen Oligonukleotide sind grundlegende Mittel für die Erzeugung von rekombinanten Nukleotidsequenzen, die an Lysin angereicherte pflanzliche Speicherproteine oder -polypeptide exprimieren können.

[0035] Die Erfindung betrifft daher auch eine rekombinante Nukleotidsequenz, die eine Verkettung von Nucleotiden umfaßt, die für ein pflanzliches Speicherprotein codiert, dadurch gekennzeichnet, daß sie weiterhin ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid umfaßt, das so an einer Stelle der Nukleotidverknüpfung insertiert ist, daß

- man durch die Expression der Nukleotidsequenz in einer bestimmten Pflanzenzelle ein modifiziertes Speicherprotein erhält, das gleich oder ähnlich wie das normale Speicherprotein, das unter den gleichen Bedingungen in der gleichen Zelle durch die entsprechende codierende Nukleotidverknüpfung exprimiert würde, lokalisiert ist, und/oder
- das modifizierte Speicherprotein, das von der Nukleotidsequenz codiert wird, von gegen das entsprechende normale Speicherprotein erzeugten Antikörpern immunologisch erkannt wird.

[0036] Insbesondere bestehen die oben genannten Antikörper aus einem polyklonalen Serum oder werden gegen Epitope des normalen Speicherproteins erzeugt, die in dem modifizierten Speicherprotein konserviert sind.

[0037] Die oben genannten pflanzlichen Zellen umfassen jegliche pflanzliche Zelle ungeachtet ihres Ursprungsgewebes oder ihrer Art. Insbesondere ist man im Rahmen der Erfindung an Zellen von Speicherorganen, jedoch auch an Zellen von Blättern, Stengeln, Knollen usw. interessiert.

[0038] Unter dem Begriff pflanzliches "Speicherprotein" versteht man im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein während der Samenreifung synthetisiertes Protein, das während der Keimungsphase als wichtigste Nährstoffreserve verwendet wird.

[0039] Allgemein handelt es sich um ein Polypeptid, das in einem Speichergewebe unabhängig von der Lage innerhalb der Pflanze synthetisiert werden kann; bei den im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendeten Speicherproteinen handelt es sich insbesondere um solche, die in den Körnern oder Samen von Pflanzen der Familie Getreide, Kreuzblütler oder Leguminosen produziert werden, zum Beispiel die Prolamine und die Zeine.

[0040] Die Wahl der Insertionsstelle(n) des Oligonukleotids in der Verknüpfung, die für das Speicherprotein der Pflanze codiert, wird aufgrund der oben genannten Bedingungen bestimmt. Die Insertion kann gegebenenfalls in einer wiederholten Domäne (in bezug auf Aminosäuren) des Proteins oder an einem C- oder N-terminalen Ende erfolgen.

[0041] Der oben genannte Fall, wo die Expression der erfindungsgemäßen rekombinanten Nukleotidsequenz in einer pflanzlichen Zelle es ermöglicht, ein modifiziertes Speicherprotein zu gewinnen, dessen Lokalisierung gleich oder ähnlich wie die des normalen Speicherproteins ist, das unter den gleichen Bedingungen in der gleichen pflanzlichen Zelle exprimiert werden würde, umfaßt zum Beispiel bei den synthetisierten γ -Zeinen die Möglichkeit der Akkumulation im endoplasmatischen Reticulum der pflanzlichen Zellen, die diese exprimieren, insbesondere in den vom endoplasmatischen Reticulum gebildeten Proteinkörpern, wenn das Protein in den Endospermzellen exprimiert wird.

[0042] Um dies mit Hilfe der erfindungsgemäßen rekombinanten Nukleotidsequenzen zu erreichen, werden aufgrund ihrer Funktionsfähigkeit in dem Gewebe, das die transformierten Zellen enthält, Expressionssysteme gewählt, die an die Wirtszelle angepaßt sind, in der die gewählte Nukleotidsequenz exprimiert wird, insbesondere Regulationselemente, zum Beispiel Promoter. Tests für die Durchführung dieser Auswahl können aufgrund der verschiedenen in den Beispielen beschriebenen Konstrukte durchgeführt werden.

[0043] Um zu überprüfen, daß die immunologischen Eigenschaften des von der erfindungsgemäßen Nukleotidsequenz exprimierten, modifizierten Speicherproteins nicht wesentlich verändert worden sind, hat man zum Beispiel Antiseren wie das Antiserum α G2, das im Versuchsteil unten genau beschrieben wird, verwendet.

[0044] Gemäß einer ersten Ausführungsform der Erfindung ist die rekombinante Nukleotidsequenz dadurch gekennzeichnet, daß sie ausgehend von einer Verkettung, die für Nukleotide codiert und die zur Expression eines normalerweise lysinarmen Speicherproteins führt, erhalten wird.

[0045] Allgemein codiert diese rekombinante Nukleotidsequenz für ein modifiziertes Speicherprotein, das von einem Speicherprotein abstammt, welches auf natürlichem Weg von einer in der tierischen oder menschlichen Ernährung verwendbaren Pflanze produziert wird.

[0046] Es handelt sich also bei den Speicherproteinen, deren Lysingehalt im Rahmen der vorliegenden Erfindung modifiziert wird, vorteilhafterweise um Speicherproteine von Pflanzen der Familie Getreide, Leguminosen oder Kreuzblütler. Besonders wichtige Speicherproteine sind diejenigen des Maises, insbesondere die Zeine, ganz besonders das Mais- γ -Zein, dessen Lysingehalt man zu erhöhen wünscht.

[0047] Eine besondere erfindungsgemäße rekombinante Nukleotidsequenz ist dadurch gekennzeichnet, daß die für das Mais- γ -Zein codierende codierende Nukleotidverknüpfung, die sie enthält, der in **Abb. 9** dargestellten Sequenz entspricht.

[0048] Andere erfindungsgemäße rekombinante Nukleotidsequenzen sind dadurch gekennzeichnet, daß die codierende Nukleotidverknüpfung, die sie enthalten, für ein Speicherprotein einer Pflanze der Gruppe Soja, Sonnenblume, Tabak, Weizen, Hafer, Luzerne, Reis, Raps, Sorghum und Arabidopsis codiert.

[0049] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist in der rekombinanten Nukleotidsequenz, die eine für das Mais- γ -Zein codierende Verknüpfung umfaßt, das erfindungsgemäße Oligonukleotid anstelle der Verkettung, die für die Pro-X-Domäne codiert, die im Mais- γ -Zein natürlich vorkommt, oder nach dieser Stelle inseriert. Die Pro-X-Domäne der Aminosäuresequenz des Mais- γ -Zeins besteht aus den Aminosäuren die zwischen den Positionen 70 und 91 der in **Abb. 9** dargestellten Aminosäuresequenz liegen, was den Nukleotiden 265 bis 330 der in **Abb. 9** dargestellten Sequenz entspricht.

[0050] Vorzugsweise liegt in der erfindungsgemäßen Nukleotidsequenz das Oligonukleotid anstelle oder nach der Pro-X-Domäne, die zwischen den Nukleotiden 276 und 357 der in **Abb. 9** dargestellten Sequenz vor.

[0051] Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist in der rekombinanten Nukleotidsequenz, die eine für das Mais- γ -Zein codierende Verknüpfung umfaßt, das erfindungsgemäße Oligonukleotid nach der Pro-X-Domäne, die in der Sequenz des Mais- γ -Zeins konserviert ist, inseriert.

[0052] Gemäß einer weiteren Ausführungsform ist in der rekombinanten Nukleotidsequenz, die eine für das Mais- γ -Zein codierende Verknüpfung umfaßt, das erfindungsgemäße Oligonukleotid in die Pro-X-Domäne, die in der Sequenz des γ -Zeins erhalten bleibt, inseriert.

[0053] Die Insertionen, um die es oben geht, können mit verfügbaren Techniken erzeugt werden, zum Beispiel mittels Rekombination von Sequenzen, mit denen zuvor ein oder mehrere enzymatische Verdauungsschritte durchgeführt wurden.

[0054] In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung wird ein an einer bestimmten Aminosäure angereichertes, ausgewähltes Speicherprotein in heterologen Pflanzenzellen exprimiert. Anders ausgedrückt wird ein in einer gegebenen Pflanze natürlich vorliegendes Speicherprotein in aminosäureangereicherter Form in einer anderen Pflanze oder in einer anderen Zelle, als derjenigen, die es natürlich produziert, exprimiert.

[0055] Außer der Verknüpfung, die für ein pflanzliches Speicherprotein und das erfindungsgemäße Oligonukleotid codiert, können erfindungsgemäße rekombinante Nukleotidsequenzen auch noch einen Expressions-

promotor umfassen, zum Beispiel einen Promotor, der aufgrund seiner spezifischen Eigenschaft für die Expression in gewissen Pflanzenteilen oder -geweben gewählt wurde, oder auch einen Promotor, der aufgrund seiner konstitutiven Eigenschaft gewählt wurde. So können die Promoter, wenn sie spezifisch sind, für Samen und/oder für bestimmte pflanzliche Organe oder Gewebe spezifisch sein. Sie können jedoch auch oder gleichzeitig für eine Wachstumsphase, zum Beispiel für ein bestimmtes Keimungsstadium, spezifisch sein.

[0056] Im Gegensatz dazu ermöglicht die Verwendung von konstitutiven Promotor die gleichbleibende und allgemeine Expression des Speicherproteins, was zu einem Wettbewerb zwischen der Expression des nativen Speicherproteins, falls vorhanden, und dem modifizierten Speicherprotein führt.

[0057] Beispielsweise sind Promotor, die für die Durchführung der Erfindung vorteilhaft sind, der Promotor des Mais- γ -Zeins, der in der 1,7 kb großen Sequenz enthalten ist, die stromaufwärts der in [Abb. 7](#) dargestellten Codiersequenz vorliegt, der Promotor des Blumenkohlmosaikvirus, nämlich der CaMV35S-Promotor (EP-B-0131623), der konstitutive Promotor des Actin-1-Gens von Reis (PCT/US 9100073) oder der samen-spezifische "high-molecular-weight Glutenin"-Promotor des Weizens (Colot, V. et al., 1987, EMBO Journal, Band 6, S. 3559–3564).

[0058] Gegebenenfalls werden diese Promotor durch weitere Regulationssequenzen vervollständigt, insbesondere durch Expressionsaktivatoren.

[0059] Beispielsweise sind weitere Promoter, die für die Durchführung der Erfindung verwendet werden können, der Promotor des Gens, das für das 2S-Speicherprotein von Arabidopsis thaliana-Samen codiert, oder der Lectin-Promotor der Bohne oder der β -Phaseolin-Promotor der Bohne.

[0060] Durch die zusätzliche Einführung von Expressionsaktivatoren in die Regulationssequenzen der erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen kann man auch die primäre Transkriptionsrate der Nukleotidsequenz erhöhen sowie gegebenenfalls die Menge der produzierten modifizierten Speicherproteine erhöhen. Aktivatoren sind zum Beispiel Introns von einkeimblättrigen Pflanzen, wie das Intron 1 des Reis-Actingens.

[0061] Die Erfindung betrifft weiterhin einen Klonierungs- und/oder Expressionsvektor, dadurch gekennzeichnet, daß er an einer für seine Replikation nicht unbedingt erforderlichen Stelle eine Nukleotidsequenz gemäß einer der oben angegebenen Definitionen umfaßt. Besonders interessante Vektoren im Zusammenhang mit der Durchführung der Erfindung sind zum Beispiel die Plasmide pP20 γ Z, pH30 γ Z oder pH45 γ Z. Das Plasmid pP20 γ Z wurde am 31. Oktober 1995 unter der Nummer I-1640 bei der CNCM (Paris, Frankreich) hinterlegt. Das Plasmid pH45 γ Z wurde am 31. Oktober 1995 unter der Nummer I-1639 bei der CNCM hinterlegt.

[0062] Die Erfindung umfaßt weiterhin ein Polypeptid, wie es von einer rekombinanten Nukleotidsequenz gemäß einer der oben angegebenen Definitionen exprimiert wird.

[0063] In Rahmen der vorliegenden Erfindung liegt bei dem Begriff "Polypeptid" keine bestimmte Begrenzung in bezug auf die Anzahl der Aminosäuren, die das Polypeptid bilden, vor. Es kann sich daher um Sequenzen, die nur einige Aminosäuren umfassen, handeln, wie dies üblicherweise unter dem Begriff "Peptide" verstanden wird, oder auch um wesentlich längere Sequenzen, wie Proteinsequenzen.

[0064] Diesbezüglich betrifft die Erfindung das modifizierte lysinreiche Mais- γ -Zein, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es von einer oben beschriebenen rekombinanten Nukleotidsequenz codiert wird.

[0065] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das an Lysin angereicherte modifizierte Mais- γ -Zein dadurch gekennzeichnet, daß seine Aminosäuresequenz mit mindestens einem Polypeptid der Formel $(P - K)_n$, in der

- n eine ganze Zahl 2 oder darüber bedeutet,
- P einen Prolin-Aminosäurerest darstellt,
- K einen Lysin-Aminosäurerest darstellt,
- das Zeichen „–“ eine Bindung zwischen den beiden Aminosäureresten, insbesondere eine peptidartige Bindung, symbolisiert, wobei die n Einheiten $(P - K)$ durch Bindungen, insbesondere peptidartige Bindungen, gebunden sind, modifiziert ist.

[0066] Gemäß einer Ausführungsvariante der Erfindung entspricht das in die Aminosäuresequenz des γ -Zeins eingeführte Polypeptid der Formel $K - (P - K)_n$.

[0067] Durch die erfindungsgemäßen Polypeptide, die einer der Formeln $(P - K)_n$, $K - (P - K)_n$ oder Varianten entsprechen, wird eine in normalem Mais- γ -Zein natürlich vorhandene Sequenz ersetzt, oder sie werden unter Deletion von einer oder mehreren Aminosäuren der Aminosäuresequenz des normalen Mais- γ -Zeins inseriert oder sie werden in die Aminosäuresequenz des normalen γ -Zeins hinzugefügt, wobei die Insertionsstelle des Polypeptids so gewählt wird, daß,

- wenn das lysinreiche modifizierte γ -Zein in einer Wirtszelle, insbesondere einer Pflanzenzelle produziert wird, es auf gleiche oder ähnliche Weise wie das normale Mais- γ -Zein, das unter den gleichen Bedingungen in der gleichen Wirtszelle produziert würde, lokalisiert ist, und/oder
- das modifizierte Mais- γ -Zein von gegen das normale Mais- γ -Zein gerichteten Antikörpern erkannt wird.

[0068] Das Protein P20 γ Z, das in [Abb. 11](#) dargestellt ist, oder die Proteine H30 γ Z oder H45 γ Z, die in [Abb. 10](#) dargestellt sind, sind bevorzugte Beispiele für die Durchführung der Erfindung und stellen an Lysin angereicherte modifizierte Mais- γ -Zeine dar.

[0069] Außerdem betrifft die Erfindung eine rekombinante Wirtszelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine oben beschriebene Nukleotidsequenz umfaßt.

[0070] Interessierende Wirtszellen sind zum Beispiel Bakterienzellen, wie Zellen von *E. coli* oder *Agrobacterium tumefaciens*. Vorzugsweise wird man sich im Rahmen der Erfindung für die stabile Expression des gewünschten modifizierten Speicherproteins Wirtszellen pflanzlichen Ursprungs bedienen.

[0071] Diese Zellen pflanzlichen Ursprungs sind zum Beispiel Zellen von Samen, von Pflanzen und zum Beispiel bevorzugt Endospermzellen von Maissamen.

[0072] Die erfindungsgemäße Nukleotidsequenz wird vorzugsweise stabil und unter solchen Bedingungen, daß das an Aminosäuren, insbesondere an Lysin, angereicherte exprimierte Speicherprotein dort lokalisiert ist, wo das entsprechende normale Protein in derselben Wirtszelle lokalisiert wäre, in das Genom der Wirtszelle eingeführt.

[0073] Für die Transformation von Wirtszellen sind verschiedene Techniken verfügbar. Um die Wirtszellen stabil oder vorübergehend zu transformieren, wird man zum Beispiel die Techniken Elektroporation, Beschuß mit DNA-haltigen Mikroprojektilen mit der Genkanone, über die Kultur von Explantaten mit *Agrobacterium tumefaciens* sowie mittels Eindringen mit Mikrofasern verwenden.

[0074] Für die Expression der erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen können außer den Endospermzellen von Maissamen auch Zellen von Soja, Sonnenblume, Tabak, Weizen, Hafer, Luzerne, Reis, Raps, Sorghum oder *Arabidopsis* verwendet werden.

[0075] Die vorliegende Anmeldung betrifft auch die Samen, die ein wie oben beschriebenes Polypeptid produzieren, sowie die Pflanzen, die dieses Polypeptid produzieren. Vorzugsweise handelt es sich bei diesen Pflanzen um Mais.

[0076] Die Erfindung betrifft auch die Samen, die von den transformierten Pflanzen, die das erfindungsgemäße Polypeptid, anders ausgedrückt das an bestimmten Aminosäuren angereicherte modifizierte Speicherpolypeptid, exprimieren, erhalten werden.

[0077] Gemäß einer besonders interessanten Ausführungsform der Erfindung werden die an Lysin angereicherten modifizierten γ -Zein-Proteine in Opaque 2-Maismutanten exprimiert. Bei diesen o2-Mutanten, die von Emerson, R.A. et al. (1935, Cornell Univ. Agric. Exp. Stn. Mem. 180) beschrieben und von Mertz, E.T. et al. (1964, Science 145:279–280) charakterisiert wurden, ist der Lysingehalt stark erhöht, wodurch die ernährungsphysiologischen Eigenschaften des Maises stark verbessert werden (weil sein niedriger Gehalt an dieser essentiellen Aminosäure dadurch ausgeglichen wird). Traditioneller Mais weist einen Lysingehalt von ungefähr 0,24% des Rohprodukts (Korn-Gesamtgewicht) auf, während Opaque-2-Mais ungefähr 0,5% Lysin aufweist. Sie weisen ungenügende agronomische Eigenschaften auf, weil ihr Endosperm wesentlich weniger glasig ist und sich als sehr brüchig erweist ("starchy"-Phänotyp). Aufgrund dessen sind sie äußerst anfällig für pathogene Organismen und während der Behandlungsschritte nach der Ernte sehr empfindlich. Dieser Phänotyp beruht nämlich auf der starken Erniedrigung von gewissen Speicherproteinen, insbesondere den Alpha-Zeinen. Opaque 2 codiert nämlich für einen Transkriptionsfaktor, der für die Expression von gewissen Zeingenen erforderlich ist (Schmidt, R.J. et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 46–50).

[0078] Mit Hilfe der traditionellen genetischen Verbesserung wurden Opaque-2-Abkömmlinge entwickelt, die die oben genannten Nachteile nicht mehr aufweisen; es handelt sich um QPM-Mais (Quality Protein Maize). In einer in jüngster Zeit durchgeführten genetischen Analyse dieses Maises (Lopes, M.A. et al., 1995, Theor. Appl. Genet. 19, 274–281) wurde gezeigt, daß nur 2 oder 3 Loci Schlüsselemente bei diesen günstigen Modifikationen sind. Aufgrund genauerer biochemischer und genetischer Analysen läßt sich das Postulat aufstellen, daß nur einer der 3 verantwortlichen Loci der γ -Zein-Locus ist. Alle Mais-Genotypen, die eine Duplikation dieses Gens in der Centromer-Region von Chromosom 7 tragen, sind Modifikatoren von Opaque 2 (Lopes, M.A. et al., 1995, Mol. Gen. Genet. 19:247:603–613).

[0079] Mit der vorliegenden Erfindung können ausgehend von Mais, der nur ein γ -Zein-Gen am Chromosom 7 enthält, Opaque-2-Mais-Mutanten hergestellt werden, die durch Hinzufügung einer rekombinanten Sequenz, die für ein an Lysin angereichertes Mais- γ -Zein codiert, vervollständigt werden. Außer der Tatsache, daß Härteeigenschaften ähnlich denen eines nichtmutierten Opaque-2-Maises erworben werden, besteht der Vorteil, daß der Lysingehalt wesentlich erhöht wird und denjenigen von QPM-Mais übertrifft.

[0080] Mit der vorliegenden Erfindung können modifizierte Opaque-2-Maismutanten hergestellt werden, in die man eine rekombinante Nukleotidsequenz, die für ein an Lysin angereichertes Mais- γ -Zein codiert, inseriert hat.

[0081] Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung von Pflanzen oder Samen, die ein modifiziertes Speicherprotein exprimieren, dadurch gekennzeichnet, daß es die folgenden Schritte umfaßt:

- a) Transformation einer Pflanzenzelle mit einer Nukleotidsequenz oder einem Vektor, wie nachstehend beschrieben, unter Bedingungen, die die stabile und funktionelle Expression des von der Nukleotidsequenz codierten modifizierten Speicherproteins gestatten;
- b) Regeneration von Pflanzen aus der transformierten Pflanzenzelle aus Schritt a) zur Gewinnung von Pflanzen, die das modifizierte Speicherprotein exprimieren, sowie
- c) gegebenenfalls Gewinnung von Samen von in Schritt b) gewonnenen modifizierten Pflanzen.

[0082] In einer vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei der transformierten Pflanze um Mais und bei dem angereicherten modifizierten Speicherprotein um an Lysin angereichertes γ -Zein.

[0083] Die Erfindung betrifft auch die mit solch einem Verfahren erhaltenen Pflanzen.

[0084] Um den Gehalt an einer bestimmten Aminosäure von erfindungsgemäßen Pflanzen zu bestimmen, kann man eine quantitative Bestimmungsvorschrift wie sie bei Zarkadas et al., 1995, J. Agri. Food. Chem., Band 43: Seiten 84–93 erwähnt wird, verwenden.

[0085] Weitere Merkmale und Vorteile der Erfindung gehen aus den Beispielen und Abbildungen unten hervor.

[0086] [Abb. 1](#) – Restriktionskarte des Plasmids pP20 γ Z.

[0087] [Abb. 2](#) – Restriktionskarte des Plasmids PH45 γ Z.

[0088] [Abb. 3](#) – Schematische Darstellung von Proteinen, die von den modifizierten und nichtmodifizierten γ -Zein-Genen codiert werden: Wildtyp- γ -Zein (γ Z), lysinreiche γ -Zeine (P20 γ Z, H30 γ Z, H45 γ Z und N13 γ Z) aufgrund der Insertion von Oligonukleotiden, die für lysinreiche Sequenzen codieren. Die Aminosäuresequenz der insertierten Polypeptide ist mit dem Ein-Buchstaben-Code für die Darstellung von Aminosäuren angegeben. Es werden die folgenden Abkürzungen verwendet:

Term: terminal;

ProX-DOMÄNE: Prolin-Xaa-Linker zwischen Domänen.

[0089] [Abb. 4](#) – In-vitro-Analyse von lysinreichen γ -Zeinen. (A) In-vitro-Translation sowie Translokation von Transkripten, die lysinreichen modifizierten γ -Zeinen entsprechen; Bahn 1, 5, 9 und 13: vollständige Translationsprodukte; Bahn 2, 6, 10 und 14: vollständige Translationsprodukte nach Translokation in Hunde-Mikrosomen (CM); Bahn 3, 7, 11 und 15: gegen Proteinase K (PK) resistente Translokationsprodukte; Bahn 4, 8, 12 und 16: Gesamtheit der Translationsprodukte nach Behandlung mit Proteinase K in Gegenwart von 0,5% Nonidet P40(NP40). (B) Immunfällung von in-vitro-Translationsprodukten, die den Proteinen γ -Zein sowie lysinreiches modifizierte γ -Zein entsprechen unter Verwendung von Antiserum α PL. Bahn 1: γ -Zein; Bahn 2: P20 γ Z; Bahn 3: H30 γ Z; Bahn 4: H45 γ Z und Bahn 5: N13 γ Z. (C) Legende wie bei (B), jedoch mit Antiserum α G2. Die

Molekulargewichtsmarker (in Kilodalton) sind links angegeben.

[0090] [Abb. 5](#) – Gewebespezifische Aktivität des Promoters von γ -Zein. Es wurden Endosperme von Mais, Embryonen und Blätter von Mais durch Beschuß mit Partikeln transformiert, wobei die in der Abbildung (rechts) dargestellten Konstrukte verwendet wurden. Die relativen Aktivitäten der Luciferase (LUC, graue Säulen) und der β -Glucuronidase (GUS, schraffierte Säulen) wurden in Form eines Multiplikators der Werte, die mit den nackten Projektielen \pm Standardabweichung der unterschiedlichen Verhältnisse ausgedrückt.

[0091] [Abb. 6](#) – Expression von lysinreichen γ -Zeinen im Endosperm unter der Aleuronschicht der Zellen. (A) Immunblot mit α PL-Antiserum, von Proteinen aus Endospermen, die mit pN13 γ Z (Linie 2), pH45 γ Z (Bahn 3), pH30 γ Z (Bahn 4) und pP20 γ Z (Bahn 5) transformiert worden waren. Die Kontrolle (Bahn 1) entspricht nicht-transformierten Endospermen. Die Molekulargewichtsmarker (in Kilodalton) sind links angegeben. (B) Expression der Transkripte H45 γ Z und N13 γ Z in vorübergehend transformierten Endospermen. Die cDNAs, die aus mit pH45 γ Z (Bahn 2), pN13 γ Z (Bahn 3) und der Kontrolle (Bahn 1) transformierten Geweben erhalten wurden, wurden mittels PCR amplifiziert und mit Hilfe eines synthetischen Oligonukleotids, das für eine lysinreiche Sequenz codiert, als Sonde analysiert.

[0092] [Abb. 7](#) – Anhäufung von lysinreichen γ -Zeinen in den Proteinkörpern des Endosperms. (A) Immunblot-Analyse mittels Antiserum α PL von Proteinkörpern, die aus mit pP20 γ Z (Bahn 1), pH30 γ Z (Bahn 2), pH45 γ Z (Bahn 3), pN13 γ Z (Bahn 4) und ohne DNA (Bahn 5) transformierten Endospermen isoliert worden waren. (B) Immunblot-Analyse mittels Antiserum α PL von Proteinkörpern, die aus mit pP20 γ Z, pH30 γ Z und pH45 γ Z transformierten Endospermen isoliert worden waren und mit Proteinase K in Gegenwart eines isotonschen Puffers (Sacch., Bahn 1, 3 und 5) oder einem hypotonischen Puffer (H₂O, Bahn 2, 4 und 6) verdaut worden waren. Die Molekulargewichtsmarker (in Kilodalton) sind links angegeben.

[0093] [Abb. 8](#) – Gemeinsame Lokalisierung der Proteine P20 γ Z und der α - und γ -Zeine in den Proteinkörpern des Mais-Endosperms. Es wurde eine immunocytochemische Analyse an Ultradünnschnitten durchgeführt, und zwar mit α PL-Antikörpern (die mit Goldpartikeln mit einem Durchmesser von 15 nm markiert waren) sowie mit α Z und α G2-Antikörpern (die mit 5-nm-Goldpartikeln markiert waren). (A) Mit pP20 γ Z transformierte und mit dem Antikörper α PL immunmarkierte Endosperm-Proteinkörper. (B) Immunlokalisierung von P20 γ Z (mit 15-nm-Goldpartikeln markiert) und von α -Zein (mit 5-nm-Goldpartikeln markiert) in Proteinkörpern, die aus mit pP20 γ Z transformierten Endospermen isoliert wurden. (C) und (D) Immunlokalisierung von P20 γ Z (mit 15-nm-Goldpartikeln markiert) und von α -Zein (mit 5-nm-Goldpartikeln markiert) in Proteinkörpern, die aus mit pP20 γ Z transformierten Endospermen isoliert wurden. Die Pfeile geben die Tangentialschnitte der Proteinkörper an.

[0094] [Abb. 9](#) – Codiersequenz für die cDNA von Mais- γ -Zein und entsprechende Aminosäuresequenz.

[0095] [Abb. 10](#) – Codiersequenz für die cDNA von Mais-H45 γ Z-Zein und entsprechende Aminosäuresequenz.

[0096] Die lysinreiche Sequenz (28 Aminosäuren) wird zwischen die Aminosäurereste 92 und 119 der in [Abb. 10](#) dargestellten Sequenz eingeführt.

[0097] [Abb. 11](#) – Codiersequenz für die cDNA von Mais-P20 γ Z-Zein und entsprechende Aminosäuresequenz.

[0098] Die lysinreiche Sequenz (14 Aminosäuren) wird zwischen die Aminosäurereste 92 und 119 der in [Abb. 11](#) dargestellten Sequenz eingeführt.

[0099] [Abb. 12](#) – Restriktionskarten der Plasmide pBin 19P20 γ Z und pBin 19H30 γ Z.

[0100] [Abb. 13](#) – Endospermen von transgenen Maispflanzen, bei denen an Lysin angereichertes γ -Zein angehäuft wird.

A und B: SDS-PAGE sowie Immunblot unter Verwendung von α PL Antiserum.

- A) 10 μ g Protein pro Spur (Transformanten mit dem Konstrukt H45 γ Z)
- Spur C: Proteinextrakt von Hybrid-Endospermen B73 \times A188 (Kontrolle)
- Spur 1: A1
- Spur 2: B1
- Spur 3: B2

Spur 4: C1
 Spur 5: D1
 Spur 6: D2
 B) 1 µg Protein pro Spur (Transformanten mit dem Konstrukt P20yZ)
 Spur C: Kontrolle
 Spur 1: A1
 Spur 2: A2
 Spur 3: B1
 Spur 4: C1
 Spur 5: D1
 Spur 6: E1
 C) SDS-PAGE und Silberfärbung (3 P20yZ-Transformanten sowie 3 H45yZ-Transformanten)

Spur 1: A2	}	10 µg Protein pro Spur
Spur 2: B1		
Spur 3: C1		
Spur 4: B1		
Spur 5: A1		
Spur 6: D2		
Spur 7: B1	}	40 µg Protein pro Spur
Spur 8: A1		
Spur 9: D2		

[0101] [Abb. 14](#) – Gehalt an an Lysin angereichertem γ -Zein pro Korn (Transformante 45yZ B1 und C1).

A: Silberfärbung; 10 µg Protein pro Spur

B: Immunblot mit Antiserum α PL; 1 µg Protein pro Spur

Spur 1 bis 5: Proteinextrakte von unterschiedlichen Endospermen der Transformante 45yZ B1.

Spur 6 bis 10: Proteinextrakte von unterschiedlichen Endospermen der Transformante 45yZ C1.

[Abb. 15:](#)

A) Gehalt an an Lysin angereichertem γ -Zein von 10 Körnern (Transformante 45yZ C1) mit Antiserum α PL; 1 µg Protein pro Spur.

Spur 1 bis 10: Extrakt von Endospermen von 10 Nachkommen.

B) Immunblot von Proteinextrakten der Endospermen 1 bis 5 aus A), die mit Antiserum α G2 markiert waren; 2 µg Protein pro Spur.

BEISPIELE

A) Herstellung von an Lysin angereichterten modifizierten γ -Zeinen und Expression dieser modifizierten Proteine nach deren Anhäufung in den Proteinkörpern der Endospermzellen von Mais

[0102] Bei dem γ -Zein handelt es sich um ein Speicherprotein des Maises mit einem Molekulargewicht von 28 kD, das reich an Schwefel ist und das in den Endospermzellen mit den α - und β - Zeinen in den Proteinkörpern des granulären endoplasmatischen Reticulums (ER) angehäuft wird (Ludevid et al., 1984, Plant Mol. Biol. 3, 227–234; Lending et al., 1984, Plant Cell 1, 1011–1023). Die von der Nukleotidsequenz der cDNA (Prat et al., 1985, Nucl. Acids Res. 13, 1493–1504) und den genomischen Klonen (Boronat et al., 1986, Plant Sci. 47, 95–102) abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt, daß das γ -Zein keine Homologie mit den Polypeptiden des α -Zein-Typs aufweist. Obwohl das γ -Zein von ein bis zwei Genen pro haploidem Genom codiert wird (Boronat et al., 1986, Plant Sci. 47, 95–102), macht es 10–15% der Gesamtproteine der Endospermen des Maises aus. Die Expression des γ -Zein-Gens in heterologen Systemen, wie *Xenopus*-Oocyten (Torrent et al., 1994, Planta 192, 512–518) sowie in *Arabidopsis thaliana* (Geli et al., 1994, Plant Cell 6, 1911–1922) zeigt, daß die Polypeptide des γ -Zeins stabil sind und als solche fähig sind, Proteinkörper zu bilden, die vom endoplasmatischen Reticulum im inneren der Zelle stammen. Weiterhin haben Deletionsanalysen von verschiedenen Strukturdomänen des γ -Zeins gezeigt, daß die N-terminale Sequenz, die die wiederholte prolinreiche Domäne beinhaltet, für die Retention des γ -Zeins im endoplasmatischen Reticulum verantwortlich ist und daß die cysteinreiche

C-terminale Domäne für die Bildung der Proteinkörper verantwortlich ist. Die Pro-X-Domäne schien weder mit der Stabilität des Proteins noch mit seiner zielgesteuerten Lokalisierung im Zusammenhang zu stehen (Geli et al., 1994, Plant Cell 6, 1911–1922).

Material und Methoden

Pflanzenmaterial

[0103] Körner von Mais der Selektion W64A im Stadium 17 TNB ("Tage nach der Befruchtung") wurden erst oberflächensterilisiert (1) und anschließend von Hand sezirt und die Pericarp- und Aleuronschicht wurde von den Endospermen getrennt. Es wurden tangentielle Schnitte so durchgeführt, daß ein großer Teil der Oberfläche unter der Aleuronschicht freigelegt wurde. Falls erforderlich wurden die Embryonen isoliert und Blätter von Pflanzen im Alter von 7 Tagen wurden sezirt, um das Epidermisgewebe zu entnehmen. Nach dem Sezieren wurden die Proben in Petrischalen auf mit MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962, Physiol. Plant. 15, 473–497) befeuchtete Papierfilter gelegt.

Plasmidkonstrukte

[0104] Es wurde eine erste Gruppe von Plasmiden, nämlich pKSG2, pHbP2, pPbP4 und pNaN1, erzeugt, um die Einführung von Restriktionsstellen in das für das γ -Zein codierende Gen zu ermöglichen. pKSG2 und pHbP2 wurden gemäß der Beschreibung in der Veröffentlichung von Torrent, M. et al. (Planta (1994) 192:512–518) beschrieben. Das Plasmid pKSG2 enthält die Codiersequenz für das γ -Zein.

[0105] Das Plasmid pHbP2 wird ausgehend von pKSG2 erhalten und enthält eine Codiersequenz für ein mutiertes γ -Zein, in der die Pro-X-Domäne des Proteins deletiert worden ist.

[0106] Das Plasmid pPbP4 wurde anschließend in zwei Klonierungsschritten erhalten: (i) das 350 Bp große Sall-PvuII-Restriktionsfragment von pKSG2 wurde in ein mit Sall und EcoRV restringiertes Bluescript-Plasmid (pBSKS, Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA) (pKSC4) kloniert, und (ii) das 600 Bp große PvuII-XbaI-Restriktionsfragment von pKSG2 wurde in die SmaI- und die XbaI-Restriktionsstelle von pKSC4 kloniert. Das neue Konstrukt pPbP4 enthält knapp vor der P-X-Domäne der γ -Zein-Codiersequenz eine nützliche EcoRI-Restriktionsstelle.

[0107] Das Plasmid pNaN1 wurde ebenfalls mit Hilfe von zwei Klonierungsschritten erhalten: (i) das 250 Bp große NaeI-XbaI-Fragment von pKSG2 wurde in das mit EcoRV-XbaI restringierte Plasmid pBSKS (pKSC8) kloniert und (ii) das 700 Bp große NaeI-HindIII-Restriktionsfragment (mit glatten Enden) von pKSG2 wurde in die HindIII-Restriktionsstelle von pKSC8 kloniert. Das neue Konstrukt, pNaN1, enthält ClaI- sowie HindIII-Restriktionsstellen an einem Ort 15 Nukleotide vor dem Stop-Codon des γ -Zeins.

[0108] Es wurden zwei synthetische Oligonukleotide, die den folgenden Sequenzen entsprechen: SEQ ID No: 1:

5'CGATGAATTCAAACCAAAGCCAAAGCCGAAGCCAAAAGAATTCAT3', und deren umgekehrte Sequenz, die SEQ ID No: 2 genannt wird, und deren Sequenz:

5'AGCTTGAATTCTTTGGCTTCGGCTTTGGCTTTGGTTTGAATTCAT3' lautet, die für lysinreiche Sequenzen mit der Bezeichnung $K(P - K)_4$ codieren, hybridisiert, mit EcoRI verdaut und in eine EcoRI-Schnittstelle von pHbP2 und pPbP4 kloniert. Es wurden drei Klone ausgewählt, nämlich pPo2 und pHo3, die die Codiersequenz für $K(P - K)_4$ enthalten, sowie pHo4, das die verkürzte Form der Codiersequenz für das γ -Zein mit $2K(P - K)_4$ in Tandemanordnung (in Form einer Sequenz $K(P - K)_4$ EF $K(P - K)_4$) der lysinreichen Codiersequenz. Die gleichen hybridisierten Oligonukleotide wurden mit den Enzymen ClaI-HindIII verdaut und in das mit Hilfe der gleichen Enzyme gespaltene Plasmid pNaN1 kloniert. Der ausgewählte Klon pNo1 enthielt die Codiersequenz für die lysinreiche Sequenz $K(P - K)_4$ am N-terminalen Ende des entsprechenden modifizierten γ -Zeins.

[0109] Für die vorübergehende Transformation des Endosperms werden die für das modifizierte γ -Zein codierenden Sequenzen von pPo2 und pHo3 in Form von HincII-NheI-Fragmenten in die SmaI- und die XbaI-Stelle von pDH51 (Pietrzah et al., 1986, Nucl. Acid Res. 14, 5857–5868), das den 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) enthält, inseriert. Das Konstrukt pP20 γ Z, das durch die oben beschriebene Insertion von HincII-NheI-Fragmenten in das Plasmid pDH51 erhalten wurde, enthält die Codiersequenz des an Lysin angereicherten γ -Zeins ([Abb. 8](#)) sowie die Signale für die 35S Sequenz des CaMV-Virus zur Bildung des 3'-Endes und der Polyadenylierung. Die chimäre Codiersequenz P20 γ Z wurde ausgehend von der Codierregion des γ -Zeins, die in dem Plasmid pKSG2 nach verschiedenen Klonierungsschritten enthalten ist, konstru-

iert. Der 1,7 kB große Promotor des γ -Zeins (Reina et al., 1990, Nucl. Acids Res. 18, 6426) wurde in die stumpfen Enden eines HindII-PvuI-Fragments in pHo4 und pNo1, die mit Xho1 restringiert worden waren und mit glatten Enden erhalten wurden, inseriert. Die Konstrukte pH45 γ Z und pN13 γ Z wurden analog erhalten.

[0110] Die neuen Konstrukte mit der Bezeichnung pP20 γ Z, pH30 γ Z, pH45 γ Z und pN13 γ Z wurden in biolistischen Beschußversuchen verwendet.

[0111] Um die Spezifität von unterschiedlichen Promotor für Pflanzengewebe zu untersuchen verwendete man zwei Konstrukte, nämlich p1,7 γ ZGUS und pCaMV35SLUC. p1,7 γ ZGUS wurde durch Insertion des 1,7 kB großen Promotors des γ -Zeins (HindIII-PvuI) in ein von pUc18 abgeleitetes Plasmid, das das GUS-Gen und die NOS-Signale für die 3'-Polyadenylierung von pBI 101.1 enthielt, erhalten (Jefferson et al., 1987, Embo. J. 6, 3901–3907). pCaMV35SLUC wurde durch Insertion des Luciferase (LUC)-Codiergens von pAHC18 (Bruce et al., 1989, P. H. 86, 9692–9696) in den Polylinker von pDH51 (Pietrzak et al., 1986, Nucl. Acids Res. 18, 6426) erhalten.

In-vitro Analyse

[0112] Die von pBSKS abgeleiteten Plasmide, die die Codiersequenzen für γ -Zein (pKSG2) und für das lysinreiche γ -Zein (pPo2, pHo3, pHo4 und pNo1) enthalten, wurden in-vitro nach Standard-Vorschriften transkribiert (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A laboratory manual, 2. Ausg., Cold Spring Harbor Laboratory Hrsg., Cold Spring Harbor, New York). Eine in-vitro-Translation und eine Translokation der synthetischen Transkripte wurden nach der Methode von Torrent et al. (1994, Panta 192, 512–518) durchgeführt, nur daß Hunde-Mikrosomen (CM) verwendet wurden, die von Promega (Madison, Wis., USA) stammten. Die Immunfällung der translatierten Produkte wurde im wesentlichen nach dem Verfahren von Borgese und Gaetani (1980) mit einem Kaninchen-Anti- γ -Zein α -G2-Serum, (Ludevid et al., 1985, Plant Sci. 41, 41–48) und einem α PL-Antiserum durchgeführt. Bei α PL handelt es sich um ein polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen das synthetische Peptid EFK(P – K)₈EF. Dieses Peptid wurde mit der von Celma et al., 1992 beschriebenen Festphasen-Synthesemethode dargestellt.

Beschuß mit Mikroprojektilen

[0113] Die Plasmid-DNA wurde nach einer von Kikkert (Plant Cell, 33:221–226, 1993) beschriebenen Vorschrift auf Goldpartikel (1,0 μ m, Biod-Rad, Lab., Richmond, CA, USA) absorbiert. Alle Ziele wurden zweimal beschossen, wobei man das BioRad-Gerät Biolistic PDS-1000/He verwendete. Die Ziele befanden sich 8 cm hinter einem Schirm, der die Makroträger stoppte, die sich 1 cm unterhalb der "Rupture-Disk" mit 900 PSI befanden. Nach dem Beschuß wurden die Proben 24 Stunden bei 26°C im Dunkeln inkubiert. Kontrollen bestanden aus den Zielen, die mit DNA-freien Mikroprojektilen beschossen wurden.

Enzymtests

[0114] Die mit den Plasmiden p1,7 γ ZGUS und pCaMV35SLUC beschossenen Gewebe wurden auf Eis in einem Puffer, der 25mM Tris, pH 7,8, 2mM DTT, 10% Glycerin und 1% Triton X-100 enthält, homogenisiert. Nach 5-minütigem Zentrifugieren bei 12.000 xg wurden die Überstände abdekantiert und das lösliche Gesamtprotein in den Extrakten wurde mit dem Bradford-Test (Bio-Rad) quantitativ bestimmt. Die GUS-Aktivität wurde durch fluorimetrische Analyse gemäß Jefferson (1987) mit 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (MUG) als Substrat getestet. Die LUC-Aktivität wurde mit dem Luciferase-Testsystem (Luciferase Assay System Kit), das von Promega vertrieben wird, gemäß den Anweisungen des Herstellers bestimmt.

Extraktion der Speicherproteine und Analyse der Proteine auf Gel

[0115] Endosperme, die mit pP20 γ Z, pH20 γ Z, pH45 γ Z und pN13 γ Z transformiert worden waren, wurden zu Mehl zermahlen und die α -Zeine wurden mit drei Reihen von Lösungsmitteln, die 70% Ethanol enthielten, extrahiert. Das verbleibende Mehl wurde an der Luft getrocknet und die Gesamtproteine wurden eine Stunde lang bei Raumtemperatur mit einem Puffer, der 0,25 M Tris-HCl, pH 6,8, 4% Natriumdodecylsulfat (SDS) und 5% 2-Mercaptoethanol enthielt, extrahiert. Die Proteinextrakte wurden mittels SDS-PAGE und Immunblot gemäß Ludevid et al., 1985, analysiert. Nitrozelluloseblätter wurden mit dem α PL-Antiserum (Verdünnung 1:500) inkubiert, und ein Konjugat aus Raifort-Peroxidase mit einem zweiten Antikörper (ECL Western Blotting System, Amersham, Buckinghamshire, Großbritannien) wurde für den Nachweis des Proteins eingesetzt.

Analyse der RNA-Expression

[0116] Die Gesamt-RNA wurde gemäß Logemas et al., 1987, extrahiert. Die komplementäre DNA (cDNA) wurde mit der reversen Transkriptase und Oligo-dT von Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA) gemäß den Anweisungen des Herstellers hergestellt, und diese RNA wurde mit einer PCR-Reaktion amplifiziert. Für die PCR verwendete Primer-Oligonukleotide waren 20 mer-Sequenzen, die dem 5'- und dem 3'-Ende des γ -Zein-Strukturgenens entsprachen. Für die Herstellung von mit ^{32}P markierten Sonden und für die Analyse der DNA auf Gel (Sambrook et al., Molecular Cloning: A laboratory manual, 2. Ausg., Cold Spring Harbor Laboratory Hrsg., Cold Spring Harbor, New York) mit einem synthetischen Oligonukleotid, das für eine lysinreiche Sequenz (siehe oben) codiert als Sonde wurden Standard-Protokolle verwendet.

Isolation der Proteinkörper und Behandlung mit Protease

[0117] Diese Protokolle sind bereits beschrieben worden (Torrent et al., *Planta*, 180:90–95, 1989).

Elektronenmikroskopie

[0118] Die Proteinkörper von Endospermen des Wildtyps und von mit pP20 γ Z transformierten Endospermen wurden 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 2,5% Paraformaldehyd in 20 mM Phosphatpuffer pH 7,2 fixiert und gemäß Geli et al. (1994, *Plant Cell* 6, 1911–1922) transformiert, wobei jeweils ein α -PL-Antiserum und ein Colloid aus Gold und Protein A mit einem Durchmesser von 15 nm verwendet wurde. Für die Doppelmarkierung wurden Ultradünnschnitte zuerst mit α -PL inkubiert und das Colloid aus Gold und Protein A (15 nm Durchmesser) wurde für den Nachweis der Antikörper eingesetzt. Nach dem Waschen wurden die Schnitte 20 Minuten mit 0,15 mg/ml Protein A inkubiert, um die Immunglobuline abzusättigen, und schließlich wurden die Gitter mit α -G2- oder α -Z1-Seren inkubiert und für den Nachweis der Antikörper wurde das Gold/Protein-A-Colloid (Durchmesser 5 nm) eingesetzt. α -Z1 ist ein polyklonales Kaninchenantiserum gegen α -Zein, das gemäß Lu-devid et al. (1985, *Plant Sci.* 41, 41–48) erhalten wird.

Ergebnisse

Konstruktion von lysinreichen γ -Zeinen

[0119] Die Erfinder haben die Wichtigkeit der wiederholten prolinreichen Domäne ("proline-rich repeat") und der cysteinreichen C-terminalen Domäne für die Zurückbehaltung des γ -Zeins im endoplasmatischen Retikulum und die Bildung von Proteinkörpern, die diese Proteine enthalten, in den Zellen von Arabidopsis-Blättern (Geli et al., 1994, *Plant Cell* 6, 1911–1922) nachgewiesen. Aufgrund dieser vorigen Ergebnisse wurde zwecks Verbesserung der ernährungsphysiologischen Eigenschaften von Mais die Möglichkeit, lysinreiche Sequenzen in verschiedene γ -Zein-Domänen zu insertieren, um ein modifiziertes, korrekt zielgesteuertes γ -Zein, das in den Endospermzellen angehäuft wird, zu erzeugen, untersucht.

[0120] Die Erfinder haben nun modifizierte γ -Zein-Gene konstruiert, und zwar durch Einführung von synthetischen Oligonukleotiden, die für lysinreiche Sequenzen codieren, an unterschiedliche Stellen der γ -Zein-Codiersequenz. Es wurden Konstrukte von modifiziertem γ -Zein so erzeugt, daß eine Platzierung von lysinreichen Codiersequenzen in den Domänen, die aus der tandemartig wiederholten Domäne und der cysteinreichen Domäne bestanden, vermieden wurden. In der Sequenz, die der Pro-X-Domäne entsprach, wurden Modifikationen der Codiersequenz des γ -Zeins durchgeführt. Weiterhin wurden, um eine Veränderung der Proteinfaltung so gering wie möglich zu halten, die lysinreichen Sequenzen $(P - K)_n$ so definiert, daß sie die Sequenz der Pro-X-Domäne nachahmten. Wie aus [Abb. 3](#) ersichtlich, wurde in das Protein P20 γ Z eine Sequenz $K(P - K)_4$ nach der Pro-X-Region eingeführt und in dem Protein H30 γ Z und in dem Protein H45 γ Z ersetzen Aminosäuresequenzen, die $K(P - K)_4$ bzw. $2K(P - K)_4$ enthalten, die Pro-X-Domäne des γ -Zeins (γ Z, [Abb. 3](#)). Um herauszufinden, ob es sich beim C-terminalen Ende um eine "permissive site" für die Einführung von lysinreichen Sequenzen handelte, wurde ein zusätzliches Protein, nämlich N13 γ Z, erzeugt, und zwar durch Insertion einer $K(P - K)_4$ -haltigen Sequenz fünf Aminosäuren stromaufwärts des C-terminalen Endes ([Abb. 3](#)).

Aktivität des γ -Zein-Promotors im Endosperm von transformiertem Mais

[0121] Um herauszufinden, ob lysinreiche γ -Zeine in den Endospermzellen exprimiert werden können, hat man zuerst nach einem wirksamen Promotor und einem Transformationssystem gesucht. Es wurden ein γ -Zein-Promotor, der eine 1,7 kB große stromaufwärtsgelegene Sequenz enthielt (Reina et al., 1990, *Nucleic Acid Research*, Bd. 18, S. 6426) und der CaMV-Promotor, der 625 Bp der Sequenz stromaufwärts des 35S-Proteins

des Blumenkohlmosaikvirus CaMV enthält, geprüft. Bis jetzt gab es keinerlei Informationen über die Funktionsanalyse von Genfusionen mit dem γ -Zein-Promotor in transgenen einkeimblättrigen Pflanzen. Um die Aktivität und die Gewebespezifität des γ -Zein-Promotors zu analysieren, wurden zwei chimäre Gene konstruiert (siehe [Abb. 5](#)). Als Verfahren für die Transformation von Mais für die Analyse des Promotors sowie für Expressionsversuche von lysinreichen γ -Zeinen wurde die vorübergehende Expression durch Beschuß mit der Genkanone (Klein et al., 1988 PNAS 85:4305) verwendet. Es wurden Mais-Endospermen im Stadium 17 TMB (17 Tage nach der Befruchtung) (Pericarp und Zellen der Aleuronschicht waren erhöht), Embryonen (17 TMB) sowie junge Blätter (im Alter von 10 Tagen) beschossen, und zwar mit Goldprojektilen, die mit Plasmid-DNA, die die beiden Konstrukte enthielt, beschichtet waren. [Abb. 5](#) zeigt die Aktivität der β -Glucuronidase (GUS) und der Luciferase (LUC) die in den drei Testgeweben, nämlich Endosperm, Embryo und Blatt, auftraten im Vergleich zum Kontrollversuch. Es ist anzumerken, daß die Ergebnisse dem Mittel von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Versuchen entsprechen. Jegliche GUS-Aktivität unter der Kontrolle des γ -Zein-Promotors war auf das Endosperm beschränkt, weil keinerlei GUS-Expression im Embryo und in den Blättern nachgewiesen wurde. Außerdem wurden die beschossenen Endosperme histochemisch gefärbt, um die Anzahl der Zellverbände, die das GUS-Protein exprimierten, zu bestimmen. Das Färbemuster bestätigte die zuvor erhaltenen Ergebnisse, die GUS wurde in den Endospermen stark exprimiert (die durchschnittliche Anzahl Zellverbände mit GUS-Färbung betrug 150 pro Endosperm) und im Embryo und in den Blättern wurden keine blauen Flecken nachgewiesen. Im Gegensatz dazu vermittelte der CaMV-35S-Promotor eine LUC-Aktivität in allen geprüften Geweben ([Abb. 5](#)), wobei trotzdem quantitative Unterschiede zwischen der relativen Aktivität des Enzyms in den Blättern und in den Embryonen im Vergleich zum Endosperm bestanden. Diese Unterschiede konnten auf eine intrinsische Variabilität der konstitutiven Aktivität des CaMV-Promotors zwischen den verschiedenen Maisgeweben oder auf ein schwaches Eindringen der mit der DNA beschichteten Partikel in die Mesophyllzellen, die ein großes Vakuolensystem enthalten, zurückgeführt werden. Im Stand der Technik gibt es Beweise dafür, daß der CaMV-Promotor üblicherweise eine schwache Aktivität in Zellen von einkeimblättrigen Pflanzen aufweist (Fromm et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5824–5828); trotzdem haben die Erfinder hier eine starke Aktivität des CaMV-Promoter in Endospermzellen gezeigt. Hieraus konnte geschlossen werden, daß die Aktivität des γ -Zein-Promotors und des CaMV-35S-Promotors in den Mais-Endospermen sehr stark war und daß sich daher diese beiden Promotor für die Kontrolle der Expression des Proteins in diesem Gewebe nützlich erweisen könnten.

[0122] Um zu bestimmen, ob die von den Konstrukten codierten Proteinmutanten für die Funktion des Transmembrantransports kompetent waren, wurden in-vitro-Transkriptions-Translations-Versuche in Gegenwart von Hunde-Pankreasmikrosomen durchgeführt. Die synthetischen Transkripte von jedem Konstrukt wurden translatiert und der Transport durch die Mikrosomenmembranen hindurch wurde durch Untersuchung des Schutzes gegen Verdauung durch Proteinase K getestet.

[0123] Diese Ergebnisse, die in [Abb. 4A](#) dargestellt sind, zeigen, daß die scheinbaren Molekulargewichte der in-vitro synthetisierten Polypeptide die eingeführten Mutationen widerspiegeln ([Abb. 4A](#), Bahn 1, 5, 9 und 13). In Gegenwart von Mikrosomen und von Proteinase K wurden keine Peptide mit niedrigem Molekulargewicht beobachtet, was zeigt, daß die vollständigen Polypeptidketten der modifizierten γ -Zeine durch die Mikrosomenmembranen hindurch transportiert worden waren ([Abb. 4A](#), Bahn 3, 7, 11 und 15). Vergleicht man das Ergebnis der Translokation der vier modifizierten γ -Zeine, so wurde beobachtet, daß das Protein H45yZ ([Abb. 4A](#), Bahn 11) das die Insertion von 10 Aminosäuren des Lysintyps enthielt, weniger stark transportiert wurde als die anderen Proteine. Es scheint, daß die negativ geladenen Reste in gewissem Ausmaß eine negative Auswirkung auf die Transportfähigkeit ausüben. Da der polyklonale Antikörper α G2, der gegen das γ -Zein gerichtet ist (Ludevid et al., 1985, Plant Sci. 41, 41–48) für die Unterscheidung zwischen dem γ -Zein des Wildtyps und den modifizierten γ -Zeinen nicht verwendet werden konnte, wurde ein Antikörper α PL gegen ein synthetisches Peptid, das die lysinreiche Aminosäuresequenz enthält, hergestellt. Anschließend wurde getestet, ob in-vitro synthetisierte modifizierte Proteine sowohl von den α G2-Antikörpern als auch von den α PL-Antikörpern erkannt wurden. Dieser Versuch ist in [Abb. 4B](#) und in [Abb. 4C](#) dargestellt, wo die synthetischen Transkripte des γ -Zeins, nämlich P20yZ, H30yZ, H45yZ und N13yZ, in-vitro translatiert worden waren und in denen die Translationsprodukte mit α PL ([Abb. 4B](#)) und mit α G2 ([Abb. 4C](#)) immungefällt wurden. Diese Ergebnisse zeigen, daß die lysinreichen γ -Zeine von den beiden Antikörpern erkannt wurden (siehe [Abb. 4B](#) und C, Bahn 2 bis 5) und daß das γ -Zein nur vom α G2-Serum erkannt wurde ([Abb. 4B](#) und C, Bahn 1). So ermöglicht die Spezifität der α PL-Antikörper für die modifizierten Proteine, zwischen dem lysinreichen γ -Zein und dem endogenen γ -Zein zu unterscheiden, wenn die modifizierten Gene in Endospermzellen exprimiert werden. Gemeinsam haben diese Versuche gezeigt, daß das Vorhandensein von lysinreichen Sequenzen die Funktion des Transmembrantransports oder das immunologische Verhalten des γ -Zeins nicht störte.

Expressionsanalyse von an Lysin angereicherten γ -Zeinen in Mais-Endospermen

[0124] Um zu untersuchen, ob das an Lysin angereicherte modifizierte γ -Zein in den Endospermzellen exprimiert und angehäuft wird, wurden Körner im Stadium 17 TNB mit DNA, die die Codiersequenzen für das Protein der vier Konstrukte (**Abb. 3**) unter der Kontrolle des CaMV-Promotors (P20 γ Z und H20 γ Z) und des γ -Zein-Promotors (H45 γ Z und N13 γ Z) enthält, beschossen. Als Kontrollen wurden Konstrukte mit Antisense-Promotor oder ohne Promotor verwendet. 24 Stunden nach der Transformation der Endosperme wurden die Gesamtproteine extrahiert und die Expression der modifizierten γ -Zeine wurde mittels Immunblotting mit dem Antikörper α PL geprüft. **Abb. 6A** zeigt, daß die chimären γ -Zein-Gene, die die Insertion (Pro-Lys)_n nach der Domäne Pro-X (P20 γ Z) enthalten oder diese ersetzen (H45 γ Z und H30 γ Z) stark exprimiert wurden und daß die Translationsprodukte wirksam in den Endospermzellen angereichert wurden (**Abb. 6A**, Bahnen 3, 4 und 5). Für jede Bahn entsprachen die Proteinextrakte ungefähr 1/3 eines beschossenen Endosperms, wodurch man abschätzen konnte, daß die Menge der modifizierten Proteine P20 γ Z, H30 γ Z und H45 γ Z pro Endosperm im Nanogramm-Bereich lag. Weiterhin wurde keinerlei quantitativer Unterschied zwischen dem Expressionsniveau der chimären Gene unter der Kontrolle des CaMV-Promotors und des γ -Zein-Promotors beobachtet, was die oben beschriebenen Ergebnisse, die mit den Markerproteinen GUS und LUC (**Abb. 5**) erhalten wurden, bestätigt. Es wurde beobachtet, daß der Antikörper α PL ein ungefähr 30 kD großes Protein, das in den Gesamtproteinextrakten, auch in den nichttransformierten Endospermen, vorlag (siehe die schwache Bande in den vier Bahnen der **Abb. 6A**) erkannte. Mit einem sequentiellen Proteinextraktionsverfahren konnte man feststellen, daß es sich bei diesem Protein nicht um ein im Wäßrigen lösliches Speicherprotein handelte.

[0125] Wie aus **Abb. 6A** (Bahn 2) hervorgeht, wurde das Protein N13 γ Z nicht einmal in Spuren nachgewiesen, was anzeigt, daß das entsprechende chimäre Gen in den Endospermzellen nicht exprimiert wurde bzw. daß das Protein N13 γ Z abgebaut worden war. Es wurden die RNAs von Endospermen, die mit DNAs, die für die Proteine H45 γ Z und N13 γ Z codieren, transformiert worden waren, sowie die RNAs von nichttransformierten Endospermen analysiert. Ausgehend von den Gesamt-RNAs wurden die cDNAs hergestellt und mittels PCR mit Hilfe von spezifischen Primern amplifiziert. **Abb. 6B** ist eine Darstellung der Southern-Blot-Analyse von drei cDNA-Proben, die mit einem Oligonukleotid hybridisiert worden waren, das für eine als Sonde verwendete Sequenz K(Pro – Lys)₄ codiert. Die Ergebnisse zeigen, daß das Gen N13 γ Z korrekt exprimiert worden war (**Abb. 6B**, Bahn 3). Das Vorliegen von Banden in den Proben H45 γ Z- und N13 γ Z bzw. das Fehlen dieser Banden in den nichttransformierten Endospermen hat nahegelegt, daß das Protein N13 γ Z während der 24-stündigen Inkubation abgebaut worden war. Aufgrund dieser Beobachtungen haben die Erfinder geschlossen, daß die Insertionsstelle der lysinreichen Sequenzen für die Stabilität des modifizierten γ -Zeins kritisch ist.

Das an Lysin angereicherte γ -Zein wird in den Proteinkörpern angehäuft

[0126] Außer dem Lysingehalt ihrer Pro-X-Sequenzen wiesen die Proteine P20 γ Z, H30 γ Z und H45 γ Z Eigenschaften auf, die auch beim γ -Zein des Wildtyps auftraten, es waren nämlich das Signalpeptid, die N-terminale in Tandemanordnung wiederholte Domäne und die C-Terminale cysteinreiche Region verwandt. Es schien wichtig, zu bestimmen, ob diese Domänen, die die Zielsteuerung und die Bildung der Proteinkörper aufrecht-erhalten, völlig funktionell bleiben oder ob die lysinreichen Sequenzen eine spezielle Umwelt erzeugten, in der diese Eigenschaften gestört werden könnten. Um diese zu prüfen hat man untersucht, ob sich die modifizierten γ -Zeine in den Proteinkörpern anhäufen konnten. Es wurde mit den transformierten Endospermen eine Fraktionierung in Zellfraktionen durchgeführt. Die Homogenate von beschossenen Endospermen wurden auf diskontinuierliche Saccharosegradienten aufgetragen (20%, 50% und 70% Saccharose), und alle gewonnenen Fraktionen wurden mittels Immunblotting analysiert. P20 γ Z, H30 γ Z und H45 γ Z wurden auf die Proteinkörperfraktion sedimentiert, und es wurde weder im Überstand noch in der Mikrosomenfraktion eine wesentliche Menge dieser Proteine nachgewiesen (**Abb. 7A**, Bahnen 2, 2 und 3). Obwohl aus den vorab durchgeführten in-vitro-Versuchen (**Abb. 4A**) hervorging, daß die neu synthetisierten modifizierten γ -Zeine in die Hunde-Mikrosomen transportiert worden waren, wurde hier geprüft, ob die in-vivo in Endospermzellen exprimierten modifizierten Proteine in die Membran des endoplasmatischen Reticulums transportiert wurden und im Inneren der vom endoplasmatischen Reticulum stammenden Proteinkörper verblieben. Aus diesem Grund wurden die isolierten Proteinkörper in isotonischen Puffern (mit 20% Saccharose) oder nach osmotischem Schock in Wasser mit Proteinase K verdaut (**Abb. 7B**). Die gegen proteolytischen Abbau durch Enzyme geschützten Proteine können von einer Membran umgeben sein und eine Behandlung mit Detergens-Lösungen oder hypotonischen Lösungen hat zum Abbau der Proteine geführt (Walter und Blobel, 1983, Method Enzymol. 96, 84–93). Mit Hilfe eines Vergleichs der Intensität der Banden nach Abbau durch Proteinase K in saccharosehaltigen Medien oder Wasser konnte gezeigt werden, daß die Proteine P20 γ Z, H30 γ Z und H45 γ Z in isotonischen Puffern gegen Abbau geschützt waren, (Bahnen 1, 3 und 5), jedoch in Wasser teilweise abgebaut wurden (Bahnen 2, 4 und 6).

[0127] Aufgrund der Expression von modifizierten γ -Zein-Genen in den Zellen unter der Aleuronschicht des Endosperms mittels Beschuß mit der Genkanone konnte beobachtet werden, daß die lysinreichen γ -Zeine großteils angehäuft wurden, außer, wenn die lysinreichen Sequenzen 5 Reste stromaufwärts vom C-terminalen Ende des γ -Zein-Polypeptids lagen. Ausgehend von dieser Expression und von immunocytochemischen Untersuchungen an isolierten Proteinkörpern haben die Erfinder nachgewiesen, daß die lysinreichen γ -Zeine korrekt in diesen Organellen angehäuft werden und an der gleichen Stelle wie die endogenen γ -Zein- und α -Zein-Proteine lokalisiert sind.

[0128] Es wurden aus P20 γ Z-Endospermen isolierte Proteinkörper mittels Immungoldmarkierung und Elektronenmikroskopie untersucht. Bei mit dem Antikörper α P-L inkubierten Ultradünnschnitten (**Abb. 8A**) wurde die Goldmarkierung im Inneren der Proteinkörper nachgewiesen, was anzeigt, daß das lysinreiche Protein P20 γ Z im Inneren dieser Organellen angehäuft wurde. In Schnitten, die nur mit dem Antikörper α P-L inkubiert wurden, erfolgte eine Immunmarkierung nur an manchen Proteinkörpern (die das lysinreiche γ -Zein enthalten), während der Großteil der isolierten Proteinkörper nicht mit dem Antikörper α P-L immunmarkiert wurde, da diese nichttransformierten Endospermzellen entsprachen. Um zu bestimmen ob das lysinreiche γ -Zein an der gleichen Stelle wie die α -Zein- und γ -Zein-Polypeptide lokalisiert war, wurde an isolierten Proteinkörpern eine immun-elektromikroskopische Doppelmarkierung mit den Antikörpern α Z und α P-L (**Abb. 8B**) bzw. α G2 und α P-L (**Abb. 8C** und **D**) durchgeführt. **Abb. 8B** zeigt eine Mikrographie des Querschnitts von zwei Proteinkörpern die, mit dem Antikörper α P-L (15 nm-Goldpartikel) und dem Antikörper α Z (5 nm-Goldpartikel) markiert worden waren. Aus dem Ergebnis der Immunfärbung geht hervor, daß das Protein P20 γ Z im Proteinkörper angehäuft wird und an der gleichen Stelle wie α -Zein lokalisiert wird (siehe, wie sich die α -Zein-Markierung über die gesamte Oberfläche der Proteinkörper erstreckt). Außerdem wurden Tangentialschnitte (**Abb. 8B**, siehe Pfeile) und Querschnitte (**Abb. 8D**) von Proteinkörpern mit dem Antikörper α P-L (15 nm-Goldpartikel) und dem Antikörper α G2 (5 nm-Goldpartikel) inkubiert. In beiden Fällen war das Protein P20 γ Z an der gleichen Stelle wie die γ -Zein-Polypeptide lokalisiert. Es konnte beobachtet werden, daß die Tangentialschnitte des Proteinkörpers (**Abb. 8A, C**, siehe Pfeile) insofern leicht von den Querschnitten des Proteinkörpers unterschieden werden konnten, als bei den ersteren eine stärkere Elektronendichte auftrat und sich die Markierung des γ -Zeins über den gesamten Schnitt erstreckte. Im Gegensatz dazu war die Dichte bei den Querschnitten schwächer und die Markierung des γ -Zeins war auf der Membran, die den Proteinkörper umgibt, lokalisiert. In beiden Fällen folgte die Lokalisierung der Markierung des lysinreichen γ -Zeins derjenigen des endogenen γ -Zeins.

B) Herstellung von genetisch modifizierten Pflanzen, die lysinreiche γ -Zeine exprimieren

1) Gewinnung und Verwendung von Maiskallus als Target für die genetische Transformation

[0129] Bei der genetischen Transformation des Maises ist im allgemeinen unabhängig von der verwendeten Methode (Elektroporation; Agrobacterium, Mikrofasern, Genkanone) die Verwendung von undifferenzierten Zellen mit aktiver Zellteilung, bei denen die Fähigkeit zur Regeneration von intakten Pflanzen erhalten ist, erforderlich. Aus dieser Art von Zellen setzt sich der lockere embryogene Maiskallus (auch Typ-IIKallus genannt) zusammen.

[0130] Diese Kalli erhält man ausgehend von unreifen Embryonen des Genotyps Hi II oder (A188 \times B73) nach der von Armstrong (Maize Handbook; (1994) M. Freeling, V. Walbot Hrsg.; S. 665–671) beschriebenen Methode auf den in dieser Arbeit beschriebenen Medien. Die so erhaltenen Kalli werden durch wiederholtes Umsetzen alle 15 Tage auf dem Initiationsmedium vermehrt und erhalten.

[0131] Ausgehend von diesen Kalli werden anschließend Pflänzchen regeneriert, und zwar dadurch, daß man das hormonale und osmotische Gleichgewicht der Zellen nach der von Vain et al. (Plant Cell Tissue and Organ Culture (1989) 18:143–151) beschriebenen Methode modifiziert. Diese Pflanzen werden anschließend im Gewächshaus abgehärtet, wo sie gekreuzt oder geselbstet werden können.

2) Verwendung der Genkanone für die genetische Transformation von Mais

[0132] Im Absatz oben wird die Gewinnung und Regeneration der für die Transformation erforderlichen Zelllinien beschrieben; hier beschreibt man ein Verfahren für die genetische Transformation, die zur stabilen Integration der modifizierten Gene in das Genom der Pflanze führt. Diese Methode beruht auf der Verwendung einer Genkanone, die der von J. Finer (Plant Cell Report (1992) 11:323–328) beschriebenen Genkanone gleicht; bei den Target-Zellen handelt es sich um Stücke von Kalli, wie sie in Absatz 1 beschrieben wurden. Diese Stücke, die eine Oberfläche von 10 bis 20 mm² aufweisen, wurden 4 Stunden vor dem Beschießen in einer Anzahl von 16 Stücken pro Schale in die Mitte einer Petrischale gelegt, welche ein Kulturmedium enthält,

das mit dem Initiationsmedium identisch ist, jedoch zusätzlich 0,2 M Mannit + 0,2 M Sorbit enthält. Die Plasmide, die die einzuführenden Gene enthalten, werden auf einer Qiagen®-Säule nach den Anweisungen des Herstellers gereinigt. Anschließend werden sie auf Wolframpartikel (M10) niedergeschlagen, wobei man wie bei Klein (Nature (1987) 327:70–73) beschrieben vorgeht. Die so beschichteten Partikel werden mit Hilfe der Kanone und der Vorschrift, wie sie bei J. Finer (Plant Cell Report (1992) 11:323–329) beschrieben sind, auf die Target-Zellen geschossen.

[0133] Die so beschossenen Kallusschalen werden anschließend mit Scellofrais® dicht verschlossen und dann bei 27°C im Dunkeln kultiviert. Ein erstes Umsetzen erfolgt 24 Stunden nachher und anschließend wird 3 Monate lang alle 15 Tage auf ein Medium umgesetzt, das mit dem Initiationsmedium identisch ist, jedoch zusätzlich ein Selektionsmittel enthält, dessen Art und Konzentration von dem verwendeten Gen abhängt (siehe Absatz 3). Die Selektionsmittel, die verwendet werden können, bestehen im allgemeinen aus Wirkstoffen von gewissen Herbiziden (Basta®, Round up®) oder gewissen Antibiotika (Hygromycin, Kanamycin usw. ...).

[0134] Nach 3 Monaten oder manchmal auch früher erhält man Kalli, deren Wachstum nicht von dem Selektionsmittel gehemmt wird und die üblicherweise und hauptsächlich aus Zellen bestehen, die aus der Teilung einer Zelle hervorgehen, die in ihr genetisches Material eine oder mehrere Kopien des Selektionsgens integriert hat. Die Häufigkeit, mit der solche Kalli erhalten werden, beträgt ungefähr 0,8 Kalli pro beschossener Schale.

[0135] Diese Kalli werden identifiziert, vereinzelt, vermehrt und anschließend so kultiviert, daß Pflänzchen regeneriert werden (vgl. Absatz 1). Um jegliche Wechselwirkung mit nichttransformierten Zellen zu vermeiden, werden alle diese Arbeitsschritte auf Kulturmedien durchgeführt, die das Selektionsmittel enthalten.

[0136] Die so regenerierten Pflanzen werden abgehärtet und anschließend im Gewächshaus herangezogen, wo sie gekreuzt oder geselbstet werden können.

3) Verwendung des Bar-Gens für die Herstellung von genetisch modifizierten Maispflanzen, die das Gen H45yZ integriert haben und dieses exprimieren

[0137] Das Bar-Gen von *Streptomyces hygroscopicus* codiert für eine Phosphinothricin-Acyltransferase (PAT), die durch Acetylierung des Phosphinothricin-Moleküls, das den Wirkstoff des Herbizids Basta® darstellt, inaktiviert ist. Die Zellen, die dieses Gen tragen, werden dadurch resistent gegen dieses Herbizid gemacht und können auf diesem Weg selektiert werden. Für die Transformation von Getreiden steht die Codiersequenz des Bar-Gens unter der Kontrolle einer Regulationsregion, die eine starke konstitutive Expression in den Pflanzenzellen ermöglicht. Solch eine Region stellt vorteilhafte Promotor und das erste Intron des Actin-Gens aus Reis dar, wie sie von Mc Elroy (Mol. Gen. Genet. (1991) 231:150–160) beschrieben werden.

[0138] Dieses chimäre Gen wird in ein Plasmid kloniert, das seine Amplifikation durch *Escherichia coli* ermöglicht. Dieses Plasmid (pDM 302 Cao (Plant Cell Report (1992) 11:586–591) kann nach seiner Amplifikation und anschließender Reinigung auf einer Qiagen®-Säule für die genetische Transformation von Mais verwendet werden, wobei man zum Beispiel wie in der oben beschriebenen Methode vorgeht. Hier werden die Kulturmedien für die Selektion der transformierten Zellen mit 2 mg/l Phosphinothricin versetzt.

[0139] Für die Einführung des Gens H45yZ verwendet man vorteilhaft die sogenannte Cotransformationstechnik:

das Selektionsgen (Bar) und das interessierende Gen (H45yZ) befinden sich auf unabhängigen Plasmiden. Hier geht man bei der Verwendung der Genkanone so vor, daß man die Plasmide gemeinsam auf die Wolframpartikel fällt, wobei die Gesamtmenge der auf die Partikel gefällten DNA gleich wie in der Standardvorschrift ist (5 µg DNA pro 2,5 mg Partikel) und jedes Plasmid ungefähr die Hälfte des verwendeten DNA-Gesamtgewichts ausmacht.

[0140] Die Erfahrung hat gezeigt, daß das (mit einer Größenordnung von 90%) häufigste Ereignis bei dieser Methode die Cointegration der Plasmide in die Pflanzenzellen ist, das heißt, daß praktisch jede Pflanze, die das Bar-Gen integriert hat und auf diesem Weg selektiert wurde, auch das H45yZ-Gen trägt. Das Coexpressionsniveau (Prozentsatz der selektierten Pflanzen), die das Gen H45yZ exprimieren liegt üblicherweise in einer Größenordnung von 70%.

[0141] Die so eingeführten Gene sind im allgemeinen genetisch gekoppelt; das Gen H45yZ kann daher vorteilhaft aufgrund der Resistenz gegen das Herbizid, mit der es eng gekoppelt ist, in den Nachkommenschaften

verfolgt werden.

[0142] Die Menge des modifizierten Proteins wird nach den in Beispiel A beschriebenen Methoden bestimmt, insbesondere durch Immunblotting anhand von Proteinextrakten von unreifen oder reifen Maiskörnern, die in gepoolter Form von Basta-resistenten Pflanzen entnommen werden.

4) Beispiel für den Schritt der Einführung von Transgenen, insbesondere des Gens, das für H45yZ codiert, für die Modifikation des Opaque-2-Phänotyps von Mais

[0143] Züchterische Verbesserung von Opaque-2-Mais durch Introgression des Gens für an Lysin angereichertes γ -Zein.

[0144] Es werden die in dem obigen Beispiel beschriebenen transformierten Pflanzen, die gleichzeitig eine Resistenz gegen Basta und die Expression eines an Lysin angereicherten γ -Zeins aufweisen, verwendet. Mit ihrem Pollen werden Opaque-2-Maispflanzen der Bahn W64Ao2, die nur ein einziges γ -Zein-Gen enthält, befruchtet. Diese Bahn wurde vom Maize Stock Center erhalten. Die Pflanzen dieser F1-Nachkommenschaft werden auf ihre Resistenz gegen Basta selektiert und anschließend geselbstet. Die so produzierten F2-Körner werden auf einem Leuchttisch auf ihren "Opaque"-Phänotyp untersucht, und die "Opaque"-Körner oder die gläsernen Körner werden ausgesät und auf ihre Resistenz gegen Basta ausgewertet. Dort, wo die "Opaque"-Körner nicht gegenüber Basta empfindlich sind, ist der Beweis erbracht, daß die Einführung des Gens für an Lysin angereichertes γ -Zein in die jeweiligen Pflanze den "Opaque-2"-Phänotyp vervollständigt.

[0145] Anschließend werden bei diesen basta-resistenten Pflanzen Einzelpflanzen mit dem Genotyp o2/o2, die nur ein einziges γ -Zein-Gen auf dem Chromosom 7 aufweisen, mit Hilfe von Molekularsonden, die für das Gen Opaque 2 und für das γ -Zein codieren, selektiert. Mit diesen molekularen Sonden werden polymorphe Restriktionsfragmente identifiziert, und nur diejenigen Einzelpflanzen, die das Muster der Bahn W64o2 aufweisen, werden ausgewählt. (Lopes, M.A. et al., 1995, Mol. Gen. Genet. 19:247, 603–613).

[0146] Diese Einzelpflanzen weisen einen Lysingehalt auf, der im Mittel dem des o2-Maises entspricht oder auch höher ist. Ausgehend von diesen Einzelpflanzen wird jegliche Introgression des Merkmals "hoher Lysingehalt" in Elite-Sorten mittels der Bestimmung der Basta-Resistenz und des Vorhandenseins des Allels o2, das mittels RFLP nachgewiesen wird, beobachtet.

5) Expression von an Lysin angereicherten γ -Zeinen in *Arabidopsis thaliana*

[0147] Um zu einer stabilen Transformation zu gelangen wurden die Plasmidkonstrukte P20yZ und pH30yZ, die in das Plasmid Bluescript KS (–) kloniert worden waren, in Form von HincII/XbaI-Fragmenten in den binären Vektor pBin19 (Bevan, M. Nucl. Acids Res. 12:8711–8721 (1984)), der den 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) und die Signale für die Bildung des 3'-Endes und für die Polyadenylierung aus dem Octopin-Synthetasegen (ocs) enthält, inseriert. Die neuen Plasmide wurden p19P20yZ und p19H30yZ genannt ([Abb. 12](#)).

[0148] Die binären Vektoren, die die Codiersequenzen für die Proteine P20yZ und H30yZ enthalten (p19P20yZ und p19H30yZ) wurden in den *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm LBA4404 eingefügt. *Arabidopsis*-Pflanzen des Ökotyps RLD wurden mit der von Valvekens, D., Van Montagu, M. et Van Lijsebettens, M. ((1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5536–5540) beschriebenen Methode transformiert. Für jedes Konstrukt wurden 10 transgene Pflanzen mittels Immunblot-Analyse unter Verwendung eines gegen γ -Zein erhaltenen Antiserums (α G2, Ludevid et al. 1985) durchmustert. Zur Gewinnung der F2-Generation wurden die Pflanzen, die den höchsten Gehalt an transgenen Produkten der F1-Generation enthielten, ausgewählt (dieser Gehalt entsprach ungefähr 0,1% der Gesamtmenge der in den Blättern von *Arabidopsis* vorhandenen Proteine). Diese Pflanzen wurden auch für die Expression des gewünschten Proteins selektiert.

[0149] Intakte transgene Pflanzen, die auf einem kanamycinhaltigen Medium selektiert worden waren, wurden in flüssigem Stickstoff homogenisiert. Die transgenen Proteine wurden selektiv mit einer Lösung, die Ethanol/Salzsäure HCl 0,125 N im Verhältnis 3:1 (v/v) mit 5% Mercaptoethanol und Proteasehemmern enthielt, extrahiert. Die mit dieser Lösung extrahierten Proteine wurden in 5 Volumina Aceton gefällt und mittels SDS-PAGE und Immunblotting analysiert. Als Kontrollen wurden die Proteinextrakte von nicht-transgenen Pflanzen verwendet. Die Proteine, die aufgrund der Insertion der K(P – K)₄-Sequenzen in das γ -Zein auftraten, wurden dadurch, daß man den konstitutiven CaMV-35S-Promotor verwendete, korrekt in den *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen exprimiert. Auf den Immunblots erkannten die Antikörper α G2 und α PL die Elektrophoreseban-

den, die den Proteinen P20 γ Z und H30 γ Z entsprechen. Diese Banden wanderten mit scheinbaren Molekulargewichten, die denjenigen entsprechen, die man zuvor in den in-vitro-Translations/Translokationsversuchen beobachtet hatte (30 kD bzw. 26 kD). Wie dies bei den transgenen Arabidopsis-Pflanzen, die das γ -Zein exprimieren, beobachtet wurde (Geli et al. Plant Cell 6:1911–1922 (1994)) wanderten die Proteine P20 γ Z und H30 γ Z in Form von zwei Elektrophoresebanden, nämlich bei P20 γ Z den Banden, die 36 und 30 kD entsprechen und bei H30 γ Z den Banden, die 32 und 26 kD entsprechen. Die höheren Banden könnten Produkten entsprechen, die aufgrund von posttranslationellen Modifikationen entstanden sind. Keine solche posttranslationelle Modifikation wurde in den transformierten Maisendospermen nachgewiesen. Dieses Ergebnis legt nahe, daß die Modifikation dann erscheinen dürfte, wenn diese Proteine in einem heterologen System wie Arabidopsis thaliana exprimiert werden.

6) Expression von rekombinanten an Lysin angereicherten γ -Zeinen in Mais

Methode:

[0150] Nach der Gewinnung der transgenen Pflanzen werden diese mit einer nichttransformierten männlichen Linie gekreuzt. Bei einer Ein-Locus-Insertion werden also 50% der geernteten Körner transgen sein. Um die an Lysin angereicherten α -Zeine in den transgenen Pflanzen zu analysieren werden die Proteine aus 6 Körnern pro Transformante extrahiert.

[0151] Die Endosperme werden dadurch herauspräpariert, daß man die Embryonen und Pericarpe von den Körnern entfernt. Die Endosperme werden gemahlen und 50 mg Mehl werden für die selektive Extraktion eingesetzt. Zuvor werden die α -Zeine dreimal mit 70%igem Ethanol extrahiert. Nach dem Zentrifugieren wird das Ethanol im Vakuum abgedampft. Die in Ethanol unlöslichen Proteine (hauptsächlich die γ -Zeine und die an Lysin angereicherten γ -Zeine) werden von dem Pellet mit einem Laemmli-Puffer, der 10% Mercaptoethanol enthält, extrahiert (100 μ l Puffer pro 10 mg Mehl). Anschließend werden die Gesamtproteine mittels Silberfärbung analysiert (Morrissey, J.H., 1981, Ann. Biochem. Band 117, S. 307–310). Die γ -Zeine und die an Lysin angereicherten γ -Zeine werden mittels Immunblotting mit den Antikörpern α G2 (Verdünnung 1/2000) bzw. α PL (Verdünnung 1/500) analysiert. Als Sekundärantikörper im Immunblot wird ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter Antikörper gegen Antikörper aus dem Kaninchen verwendet. Die Extrakte werden verdünnt, um auf die SDS-PAGE nach dem verwendeten Analyseverfahren aufgetragen werden zu können.

Ergebnisse:

Anhäufung von an Lysin angereicherten γ -Zeinen in den transgenen Maispflanzen 20 γ Z und 45 γ Z:

[0152] [Abb. 13](#) zeigt den Immunblot der Proteinextrakte nach Nachweis mit Antiserum α PL (A, B) und die Gesamtproteine nach Silberfärbung (C). Wie aus [Abb. 13A](#) ersichtlich, wurden 6 transgene 20 γ Z-Pflanzen mit dem Antiserum α PL geprüft, und an Lysin angereichertes γ -Zein wird in den transgenen Pflanzen A1 und D2 exprimiert (Bahn 1 bzw. 6). Bei der Pflanze C1 (Bahn 4) werden nur Spuren von an Lysin angereichertem γ -Zein beobachtet. Wenn die Extrakte der 6 transgenen Pflanzen 45 γ Z auf das Gel aufgetragen werden und mit dem Antiserum α PL markiert werden ([Abb. 13B](#)), so beobachtet man bei den Transformanten B1 und C1 eine starke Reaktion mit dem Antikörper (Bahn 3 bzw. 4).

[0153] Es ist anzumerken, daß die Antikörperreaktion bei den Extrakten von Endospermen der Pflanzen 45 γ Z B1 und C1 stärker ist als bei den Extrakten der Pflanzen 20 γ Z A1 und D2. Dieses Ergebnis wird nach Anfärbung der Gele mit Silber bestätigt ([Abb. 13C](#)), wo die beiden γ -Zein-Typen, nämlich endogenes und an Lysin angereichertes Zein, angefärbt werden. Das an Lysin angereicherte γ -Zein weist ein scheinbares Molekulargewicht von 30 kDa und das endogene γ -Zein ein scheinbares Molekulargewicht von 28 kDa auf. Die Expression des an Lysin angereicherten γ -Zeins ist in der Pflanze 45 γ Z B1 schwächer als bei C1 (Bahn 2 bzw. 3). Bei den Bahnen 1 bis 6 in [Abb. 13C](#) wurde eine identische Verdünnung der Proteine von Extrakten der Endosperme der Pflanzen 45 γ Z und 20 γ Z auf das Gel aufgetragen. Bei dieser Verdünnung wird die Expression des an Lysin angereicherten γ -Zeins nur bei den Endospermen der Pflanzen 45 γ Z B1 und C1 nachgewiesen. Wird jedoch ein höher konzentrierter Extrakt der 20 γ Z-Proteine auf das Gel aufgetragen (40 μ g Protein pro Bahn), so wird bei den Endospermen 20 γ Z A1 und D2 eine schwache Bande (siehe Pfeil), die dem an Lysin angereicherten γ -Zein entspricht, nachgewiesen. Aus diesem Ergebnis geht hervor, daß die 45 γ Z-Pflanzen wesentlich mehr erfindungsgemäße Proteine anhäufen als die 20 γ Z-Pflanzen. Dies beruht vermutlich auf den unterschiedlichen Promotoraktivitäten. Die 45 γ Z-Pflanzen waren mit einem Konstrukt transformiert worden, das das erfindungsgemäße γ -Zein unter der Kontrolle des γ -Zein-Promotors (1,7 kb) enthält, während die 20 γ Z-Pflanzen mit der gleichen Codiersequenz, jedoch unter der Kontrolle des CaMV-35S-Promotors, transformiert wor-

den waren. Die Silberfärbung ist eine allgemeine Proteinfärbetechnik, die dunkelbraune Farbe wird jedoch in erster Linie beim Vorhandensein von basischen Proteinen beobachtet. Da die α -Zeine wie oben beschrieben aus Mehl extrahiert worden waren, fehlen sie in der SDS-PAGE-Analyse von **Abb. 13C**.

Aufspaltung

[0154] Da im Fall eines einzigen Locus bei allen transgenen Pflanzen 50% Aufspaltung auftritt, wurde eine Einzelkornanalyse durchgeführt, um den Gehalt an an Lysin angereichertem γ -Zein für jede Transformante quantitativ zu bestimmen. Die Analyse wurde nur mit den 45yZ-Transformanten, die das höchste Expressionsniveau aufwiesen, durchgeführt. In **Abb. 14** sind die Silberfärbung (A) und der Immunblot mit α PL (B) von 5 unterschiedlichen Endospermen von 45yZ B1 und C1 dargestellt. Die in allen Bahnen vorhandene schwache elektrophoretische Bande (siehe A, Bahn 1 bis 10) entspricht dem endogenen γ -Zein. Wie aus **Abb. 14A** ersichtlich wird bei 2 der 5 Endosperme an Lysin angereichertes γ -Zein angehäuft siehe Bahn 3, 4 und 6, 7). Es werden also bei ungefähr der Hälfte der Körner beträchtliche Mengen an an Lysin angereichterten Proteinen angehäuft. Angesichts der Tatsache, daß gleiche Proteinmengen auf das Gel aufgetragen wurden, wird beobachtet, daß die Transformante 45yZ C1 mehr an Lysin angereichertem γ -Zein angehäuft hat als B1. Dieses Ergebnis stimmt also mit den Beobachtungen bei der Silberfärbung der Endosperm-Mischextrakte überein (**Abb. 13C**, Bahn 3). Der Beweis dafür, daß an Lysin angereichertes γ -Zein in diesen Endospermen vorliegt, wird in **Abb. 14B** verdeutlicht. Der Immunblot mit dem Antiserum α PL zeigt, daß 2 Endospermextrakte von 45yZ B1 (Bahn 3 und 4) sowie von 45yZ C1 (Bahn 4 und 6) an Lysin angereichertes γ -Zein anhäufen. Um diesen Prozentsatz der transgenen Körner zu bestätigen wurden 10 weitere Körner der Transformante 45yZ C1 mittels Immunblot unter Verwendung des Antiserums α PL analysiert (**Abb. 15A**). Wie erwartet werden ungefähr die Hälfte der Körner als transgen nachgewiesen. In den Endospermextrakten wurde eine immunreaktive Bande nachgewiesen (Bahn 1, 2, 9 und 10).

Quantitative Schätzung der an Lysin angereichterten γ -Zeine in den Endospermen der 45yZ-Transformanten:

[0155] Bei α G2 handelt es sich um ein polyklonales Antiserum, das die endogenen γ -Zeine und die an Lysin angereichterten γ -Zeine erkennt. Die Reaktionsfähigkeit dieses Antiserums mit den Extrakten der Endosperme 45yZ C1 wurde für die quantitative Bestimmung der erfindungsgemäßen an Lysin angereichterten γ -Zeine in den Endospermen der transformierten Pflanzen eingesetzt.

[0156] **Abb. 15B** ist eine Darstellung des Immunblots von 5 Proteinextrakten, die 5 45yZ-C1-Endospermen entsprechen (Bahn 1 bis 5). Wie erwartet wiesen nur 2 Endosperme ein für die transgenen Körner charakteristisches Immunreaktionsprofil auf. Die obere Bande mit 30 kDa entspricht dem an Lysin angereichterten γ -Zein (Pfeil in Bahn 1 und 2) und die untere Bande entspricht dem endogenen γ -Zein. Es ist festzustellen, daß bei den Endospermen von nichttransgenen Pflanzen die obere Bande fehlt (Bahn 3, 4 und 5). Überraschenderweise scheint es, daß der endogene γ -Zein-Gehalt in den Extrakten von transgenen Pflanzen niedriger ist als bei den nichttransgenen Pflanzen (siehe Pfeile in Bahn 1 und 5).

[0157] Auf den ersten Blick wurde also folgendes beobachtet:

- i) in den transgenen Endospermen 45yZ C1 beträgt das Verhältnis zwischen an Lysin angereichertem γ -Zein und endogenem Zein 7/3. Die Menge an erfindungsgemäßem modifiziertem Protein ist daher mindestens zweimal höher als die Menge an endogenem Protein.
- ii) die Menge an endogenem γ -Zein in den nichttransgenen Endospermen (siehe Bahn 3, 4 und 5) entsprach derjenigen des an Lysin angereichterten γ -Zeins in den transgenen Endospermen (siehe Bahn 1 und 2).

7) Expression von rekombinanten an Lysin angereichterten γ -Zeinen in Weizen

[0158] Wie in Beispiel 6) kann das Vorliegen von erfindungsgemäßen an Lysin angereichterten γ -Zeinen in Weizen gezeigt werden.

[0159] Die Transformation von Weizen kann insbesondere nach der bei Weeks et al., 1993, Plant Physiol., Band 102: Seiten 1077–1085 beschriebenen Methode oder nach der in EP-709462 beschriebenen Methode durchgeführt werden.

Sequenzprotokoll

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: BIOCEM
- (B) STRASSE : Campus Universitaire des
Cezeaux - 24 avenue des Landais
- (C) ORT: AUBIERE
- (E) LAND: FRANKREICH
- (F) POSTLEITZAHL: 63170

(ii) ANMELDETITEL: AN AMINOSÄUREN, INSBESONDERE AN
LYSIN ANGEREICHERTES MAIS- γ -ZEIN, ANGEREICHETERTE
PFLANZLICHE SPEICHERPROTEINE. PFLANZEN, DIE DIESE
PROTEINE EXPRIMIEREN.

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 11

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

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

(v) VORLIEGENDE PATENTANMELDUNG:

ANMELDENUMMER: PCT/FR 97/00167

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 44 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "OLIGONUKLEOTID"

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 1:

CGATGAATTC AAACCAAAGC CAAAGCCGAA GCCAAAAGAA TTCA 44

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (B) LÄNGE: 46 Basenpaare
 - (C) ART: Nukleotid
 - (D) STRANGFORM: Einzel
 - (E) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure
 - (F) BESCHREIBUNG: /desc = "OLIGONUKLEOTID"

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 2:

AGCTTGAATT CTTTTGGCTT CGGCTTTGGC TTTGGTTTGA ATTCAT 46

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 17 Aminosäuren
 - (G) ART: Aminosäure
 - (H) STRANGFORM: Einzel
 - (I) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 3:

Ile Glu Phe Lys Pro Lys Pro Lys Pro Lys Pro Lys Glu Phe Leu Gln
1 5 10 15
Pro

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 28 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 4:

Ile Glu Phe Lys Pro Lys Pro Lys Pro Lys Pro Lys Glu Phe Lys Pro
1 5 10 15
Lys Pro Lys Pro Lys Pro Lys Glu Phe Leu Gln Pro
20 25

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 5:

Asp Gly Ile Asp Glu Phe Lys Pro Lys Pro Lys Pro Lys Pro Lys Glu
1 5 10 15
Phe Lys Leu Asp
20

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 672 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotide
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) Merkmale:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 1..669
- (D) WEITERE INFORMATIONEN: / note =
"CODIERSEQUENZ DER cDNA DES GAMMA-ZEINS UND
ENTSPRECHENDE AMINOSÄURESEQUENZ"

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 6:

ATG AGG GTG TTG CTC GTT GCC CTC GCT CTC CTG GCT CTC GCT GCG AGC	48
Met Arg Val Leu Leu Val Ala Leu Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ser	
1 5 10 15	
GCC ACC TCC ACG CAT ACA AGC GGC GGC TGC GGC TGC CAG CCA CCG CCG	96
Ala Thr Ser Thr His Thr Ser Gly Gly Cys Gly Cys Gln Pro Pro Pro	
20 25 30	
CCG GTT CAT CTA CCG CCG CCG GTG CAT CTG CCA CCT CCG GTT CAC CTG	144
Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu	
35 40 45	
CCA CCT CCG GTG CAT CTC CCA CCG CCG GTC CAC CTG CCG CCG CCG GTC	192
Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val	
50 55 60	
CAC CTG CCA CCG CCG GTC CAT GTG CCG CCG CCG GTT CAT CTG CCG CCG	240
His Leu Pro Pro Pro Val His Val Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro	
65 70 75 80	
CCA CCA TGC CAC TAC CCT ACT CAA CCG CCC CGG CCT CAG CCT CAT CCC	288
Pro Pro Cys His Tyr Pro Thr Gln Pro Pro Arg Pro Gln Pro His Pro	
85 90 95	
CAG CCA CAC CCA TGC CCG TGC CAA CAG CCG CAT CCA AGC CCG TGC CAG	336
Gln Pro His Pro Cys Pro Cys Gln Gln Pro His Pro Ser Pro Cys Gln	
100 105 110	
CTG CAG GGA ACC TGC GGC GTT GGC AGC ACC CCG ATC CTG GGC CAG TGC	384
Leu Gln Gly Thr Cys Gly Val Gly Ser Thr Pro Ile Leu Gly Gln Cys	
115 120 125	
GTC GAG TTT CTG AGG CAT CAG TGC AGC CCG ACG GCG ACG CCC TAC TGC	432
Val Glu Phe Leu Arg His Gln Cys Ser Pro Thr Ala Thr Pro Tyr Cys	
130 135 140	
TCG CCT CAG TGC CAG TCG TTG CGG CAG CAG TGT TGC CAG CAG CTC AGG	480
Ser Pro Gln Cys Gln Ser Leu Arg Gln Gln Cys Cys Gln Gln Leu Arg	
145 150 155 160	
CAG GTG GAG CCG CAG CAC CGG TAC CAG GCG ATC TTC GGC TTG GTC CTC	528
Gln Val Glu Pro Gln His Arg Tyr Gln Ala Ile Phe Gly Leu Val Leu	
165 170 175	
CAG TCC ATC CTG CAG CAG CAG CCG CAA AGC GGC CAG GTC GCG GGG CTG	576
Gln Ser Ile Leu Gln Gln Gln Pro Gln Ser Gly Gln Val Ala Gly Leu	
180 185 190	
TTG GCG GCG CAG ATA GCG CAG CAA CTG ACG GCG ATG TGC GGC CTG CAG	624
Leu Ala Ala Gln Ile Ala Gln Gln Leu Thr Ala Met Cys Gly Leu Gln	
195 200 205	
CAG CCG ACT CCA TGC CCC TAC GCT GCT GCC GGC GGT GTC CCC CAC	669
Gln Pro Thr Pro Cys Pro Tyr Ala Ala Ala Gly Gly Val Pro His	
210 215 220	
TGA	672

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 223 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 7:

```

Met Arg Val Leu Leu Val Ala Leu Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ser
 1           5           10           15
Ala Thr Ser Thr His Thr Ser Gly Gly Cys Gly Cys Gln Pro Pro Pro
 20           25           30
Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu
 35           40           45
Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val
 50           55           60
His Leu Pro Pro Pro Val His Val Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro
 65           70           75           80
Pro Pro Cys His Tyr Pro Thr Gln Pro Pro Arg Pro Gln Pro His Pro
 85           90           95
Gln Pro His Pro Cys Pro Cys Gln Gln Pro His Pro Ser Pro Cys Gln
 100          105          110
Leu Gln Gly Thr Cys Gly Val Gly Ser Thr Pro Ile Leu Gly Gln Cys
 115          120          125
Val Glu Phe Leu Arg His Gln Cys Ser Pro Thr Ala Thr Pro Tyr Cys
 130          135          140
Ser Pro Gln Cys Gln Ser Leu Arg Gln Gln Cys Cys Gln Gln Leu Arg
 145          150          155          160
Gln Val Glu Pro Gln His Arg Tyr Gln Ala Ile Phe Gly Leu Val Leu
 165          170          175
Gln Ser Ile Leu Gln Gln Gln Pro Gln Ser Gly Gln Val Ala Gly Leu
 180          185          190
Leu Ala Ala Gln Ile Ala Gln Gln Leu Thr Ala Met Cys Gly Leu Gln
 195          200          205
Gln Pro Thr Pro Cys Pro Tyr Ala Ala Ala Gly Gly Val Pro His
 210          215          220

```

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 693 Basenpaare

- (B) ART: Nukleotid
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(ix) Merkmale:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 1..690

(D) WEITERE INFORMATIONEN: / note =
 "CODIERSEQUENZ DER cDNA DES MAIS-H45GAMMA-Z-
 ZEINS UND ENTSPRECHENDE AMINOSÄURESEQUENZ"

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 8:

ATG AGG GTG TTG CTC GTT GCC CTC GCT CTC CTG GCT CTC GCT GCG AGC	48
Met Arg Val Leu Leu Val Ala Leu Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ser	
225 230 235	
GCC ACC TCC ACG CAT ACA AGC GGC GGC TGC GGC TGC CAG CCA CCG CCG	96
Ala Thr Ser Thr His Thr Ser Gly Gly Cys Gly Cys Gln Pro Pro Pro	
240 245 250 255	
CCG GTT CAT CTA CCG CCG CCG GTG CAT CTG CCA CCT CCG GTT CAC CTG	144
Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu	
260 265 270	
CCA CCT CCG GTG CAT CTC CCA CCG CCG GTC CAC CTG CCG CCG CCG GTC	192
Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val	
275 280 285	
CAC CTG CCA CCG CCG GTC CAT GTG CCG CCG CCG GTT CAT CTG CCG CCG	240
His Leu Pro Pro Pro Val His Val Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro	
290 295 300	
CCA CCA TGC CAC TAC CCT ACT CAA CCG CCC CGG ATC GAA TTC AAA CCA	288
Pro Pro Cys His Tyr Pro Thr Gln Pro Pro Arg Ile Glu Phe Lys Pro	
305 310 315	
AAG CCA AAG CCG AAG CCA AAA GAA TTC AAA CCA AAG CCA AAG CCG AAG	336
Lys Pro Lys Pro Lys Pro Lys Glu Phe Lys Pro Lys Pro Lys Pro Lys	
320 325 330 335	
CCA AAA GAA TTC CTG CAG CCC CTG CAG GGA ACC TGC GGC GTT GGC AGC	384
Pro Lys Glu Phe Leu Gln Pro Leu Gln Gly Thr Cys Gly Val Gly Ser	
340 345 350	
ACC CCG ATC CTG GGC CAG TGC GTC GAG TTT CTG AGG CAT CAG TGC AGC	432
Thr Pro Ile Leu Gly Gln Cys Val Glu Phe Leu Arg His Gln Cys Ser	
355 360 365	
CCG ACG GCG ACG CCC TAC TGC TCG CCT CAG TGC CAG TCG TTG CCG CAG	480
Pro Thr Ala Thr Pro Tyr Cys Ser Pro Gln Cys Gln Ser Leu Arg Gln	
370 375 380	

CAG TGT TGC CAG CAG CTC AGG CAG GTG GAG CCG CAG CAC CGG TAC CAG	528
Gln Cys Cys Gln Gln Leu Arg Gln Val Glu Pro Gln His Arg Tyr Gln	
385 390 395	
GCG ATC TTC GGC TTG GTC CTC CAG TCC ATC CTG CAG CAG CAG CCG CAA	576
Ala Ile Phe Gly Leu Val Leu Gln Ser Ile Leu Gln Gln Gln Pro Gln	
400 405 410 415	
AGC GGC CAG GTC GCG GGG CTG TTG GCG GCG CAG ATA GCG CAG CAA CTG	624
Ser Gly Gln Val Ala Gly Leu Leu Ala Ala Gln Ile Ala Gln Gln Leu	
420 425 430	
ACG GCG ATG TGC GGC CTG CAG CAG CCG ACT CCA TGC CCC TAC GCT GCT	672
Thr Ala Met Cys Gly Leu Gln Gln Pro Thr Pro Cys Pro Tyr Ala Ala	
435 440 445	
GCC GGC GGT GTC CCC CAC TGA	693
Ala Gly Gly Val Pro His	
450	

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 230 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 9:

```

Met Arg Val Leu Leu Val Ala Leu Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ser
 1                               5 10 15
Ala Thr Ser Thr His Thr Ser Gly Gly Cys Gly Cys Gln Pro Pro Pro
 20 25 30
Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu
 35 40 45
Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val
 50 55 60
His Leu Pro Pro Pro Val His Val Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro
 65 70 75 80
Pro Pro Cys His Tyr Pro Thr Gln Pro Pro Arg Ile Glu Phe Lys Pro
 85 90 95
Lys Pro Lys Pro Lys Pro Lys Glu Phe Lys Pro Lys Pro Lys Pro Lys
 100 105 110
Pro Lys Glu Phe Leu Gln Pro Leu Gln Gly Thr Cys Gly Val Gly Ser
 115 120 125
Thr Pro Ile Leu Gly Gln Cys Val Glu Phe Leu Arg His Gln Cys Ser
 130 135 140
Pro Thr Ala Thr Pro Tyr Cys Ser Pro Gln Cys Gln Ser Leu Arg Gln
 145 150 155 160
Gln Cys Cys Gln Gln Leu Arg Gln Val Glu Pro Gln His Arg Tyr Gln
 165 170 175
Ala Ile Phe Gly Leu Val Leu Gln Ser Ile Leu Gln Gln Gln Pro Gln
 180 185 190
Ser Gly Gln Val Ala Gly Leu Leu Ala Ala Gln Ile Ala Gln Gln Leu
 195 200 205
Thr Ala Met Cys Gly Leu Gln Gln Pro Thr Pro Cys Pro Tyr Ala Ala
 210 215 220
Ala Gly Gly Val Pro His
 225 230

```

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 723 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(iii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(ix) Merkmale:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 1..720

(D) WEITERE INFORMATIONEN: / note =
 "CODIERSEQUENZ DER cDNA DES MAIS-P20GAMMA-Z-
 ZEINS UND ENTSPRECHENDE AMINOSÄURESEQUENZ"

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 10:

ATG AGG GTG TTG CTC GTT GCC CTC GCT CTC CTG GCT CTC GCT GCG AGC	48
Met Arg Val Leu Leu Val Ala Leu Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ser	
235 240 245	
GCC ACC TCC ACG CAT ACA AGC GGC GGC TGC GGC TGC CAG CCA CCG CCG	96
Ala Thr Ser Thr His Thr Ser Gly Gly Cys Gly Cys Gln Pro Pro Pro	
250 255 260	
CCG GTT CAT CTA CCG CCG CCG GTG CAT CTG CCA CCT CCG GTT CAC CTG	144
Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu	
265 270 275	
CCA CCT CCG GTG CAT CTC CCA CCG CCG GTC CAC CTG CCG CCG CCG GTC	192
Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val	
280 285 290	
CAC CTG CCA CCG CCG GTC CAT GTG CCG CCG CCG GTT CAT CTG CCG CCG	240
His Leu Pro Pro Pro Val His Val Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro	
295 300 305 310	
CCA CCA TGC CAC TAC CCT ACT CAA CCG CCC CGG CCT CAG CCT CAT CCC	288
Pro Pro Cys His Tyr Pro Thr Gln Pro Pro Arg Pro Gln Pro His Pro	
315 320 325	
CAG CCA CAC CCA TGC CCG TGC CAA CAG CCG CAT CCA AGC CCG TGC CAG	336
Gln Pro His Pro Cys Pro Cys Gln Gln Pro His Pro Ser Pro Cys Gln	
330 335 340	
ATC GAA TTC AAA CCA AAG CCA AAG CCG AAG CCA AAA GAA TTC CTG CAG	384
Ile Glu Phe Lys Pro Lys Pro Lys Pro Lys Pro Lys Glu Phe Leu Gln	
345 350 355	

CCC CTG CAG GGA ACC TGC GGC GTT GGC AGC ACC CCG ATC CTG GGC CAG Pro Leu Gln Gly Thr Cys Gly Val Gly Ser Thr Pro Ile Leu Gly Gln 360 365 370	432
TGC GTC GAG TTT CTG AGG CAT CAG TGC AGC CCG ACG GCG ACG CCC TAC Cys Val Glu Phe Leu Arg His Gln Cys Ser Pro Thr Ala Thr Pro Tyr 375 380 385 390	480
TGC TCG CCT CAG TGC CAG TCG TTG CGG CAG CAG TGT TGC CAG CAG CTC Cys Ser Pro Gln Cys Gln Ser Leu Arg Gln Gln Cys Cys Gln Gln Leu 395 400 405	528
AGG CAG GTG GAG CCG CAG CAC CGG TAC CAG GCG ATC TTC GGC TTG GTC Arg Gln Val Glu Pro Gln His Arg Tyr Gln Ala Ile Phe Gly Leu Val 410 415 420	576
CTC CAG TCC ATC CTG CAG CAG CAG CCG CAA AGC GGC CAG GTC GCG GGG Leu Gln Ser Ile Leu Gln Gln Gln Pro Gln Ser Gly Gln Val Ala Gly 425 430 435	624
CTG TTG GCG GCG CAG ATA GCG CAG CAA CTG ACG GCG ATG TGC GGC CTG Leu Leu Ala Ala Gln Ile Ala Gln Gln Leu Thr Ala Met Cys Gly Leu 440 445 450	672
CAG CAG CCG ACT CCA TGC CCC TAC GCT GCT GCC GGC GGT GTC CCC CAC Gln Gln Pro Thr Pro Cys Pro Tyr Ala Ala Gly Gly Val Pro His 455 460 465 470	720
TGA	723

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 240 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 11:

Met Arg Val Leu Leu Val Ala Leu Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ser
 1 5 10 15
 Ala Thr Ser Thr His Thr Ser Gly Gly Cys Gly Cys Gln Pro Pro Pro
 20 25 30
 Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu
 35 40 45
 Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val
 50 55 60
 His Leu Pro Pro Pro Val His Val Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro
 65 70 75 80
 Pro Pro Cys His Tyr Pro Thr Gln Pro Pro Arg Pro Gln Pro His Pro
 85 90 95
 Gln Pro His Pro Cys Pro Cys Gln Gln Pro His Pro Ser Pro Cys Gln
 100 105 110
 Ile Glu Phe Lys Pro Lys Pro Lys Pro Lys Pro Lys Glu Phe Leu Gln
 115 120 125
 Pro Leu Gln Gly Thr Cys Gly Val Gly Ser Thr Pro Ile Leu Gly Gln
 130 135 140
 Cys Val Glu Phe Leu Arg His Gln Cys Ser Pro Thr Ala Thr Pro Tyr
 145 150 155 160
 Cys Ser Pro Gln Cys Gln Ser Leu Arg Gln Gln Cys Cys Gln Gln Leu
 165 170 175
 Arg Gln Val Glu Pro Gln His Arg Tyr Gln Ala Ile Phe Gly Leu Val
 180 185 190
 Leu Gln Ser Ile Leu Gln Gln Gln Pro Gln Ser Gly Gln Val Ala Gly
 195 200 205
 Leu Leu Ala Ala Gln Ile Ala Gln Gln Leu Thr Ala Met Cys Gly Leu
 210 215 220
 Gln Gln Pro Thr Pro Cys Pro Tyr Ala Ala Ala Gly Gly Val Pro His
 225 230 235 240

Patentansprüche

1. Rekombinante Nukleotidsequenz, die eine Verknüpfung von Nukleotiden, die für ein Speicherprotein der Familie der Zeine codieren, umfaßt, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie weiterhin ein Oligonukleotid umfaßt, das aus der Reihe

a) Oligonukleotid, das mindestens eine Verknüpfung, die für ein Polypeptid der Formel $(P - K)_n$, in der

– n eine ganze Zahl 2 oder darüber bedeutet,

– P einen Prolin-Aminosäurerest darstellt,

– K einen Lysin-Aminosäurerest darstellt,

das Zeichen „-“ eine Bindung zwischen den beiden Aminosäureresten, insbesondere eine peptidartige Bindung, symbolisiert, wobei die n Einheiten $(P - K)$ untereinander ebenfalls durch solche Bindungen, zum Beispiel peptidartige Bindungen, gebunden sind, codiert, umfaßt,

b) Oligonukleotid gemäß a), in dem n eine ganze Zahl 3 oder darüber, vorzugsweise 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 oder 15, bedeutet,

c) Oligonukleotid gemäß a) oder b), in dem die Sequenz der n Einheiten (PK) durch einen oder mehrere Aminosäurereste, die von den Resten P oder K verschieden sind, unterbrochen ist,

d) Oligonukleotid gemäß a), b) oder c), das an seinem 5'- und/oder 3'-Ende durch ein oder mehrere Codons vervollständigt ist,

e) Oligonukleotid gemäß a), b), c) oder d), das an seinem 5'- und/oder 3'-Ende durch einen Lysinrest am N-terminalen Ende des gebildeten Polypeptids vervollständigt ist,

f) Oligonukleotid gemäß e), das für ein Polypeptid der Formel $(P - K)_n$, der Formel $K(P - K)_4$ oder der Formel

$2K(P - K)_4$ codiert,
stammt,

wobei das Oligonukleotid an einer Stelle der Nukleotidverknüpfung inseriert ist, die so gewählt ist, daß
– man durch die Expression der Nukleotidsequenz in einer bestimmten Pflanzenzelle ein modifiziertes Speicherprotein der Familie der Zeine erhält, das gleich oder ähnlich wie das normale Speicherprotein, das unter den gleichen Bedingungen in der gleichen Zelle durch die entsprechende codierende Nukleotidverknüpfung exprimiert würde, lokalisiert ist, und/oder

– das modifizierte Speicherprotein der Familie der Zeine, das von der rekombinanten Nukleotidsequenz codiert wird, von gegen das entsprechende normale Speicherprotein erzeugten Antikörpern immunologisch erkannt wird.

2. Rekombinante Nukleotidsequenz nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Oligonukleotid am N- oder C-terminalen Ende der Nukleotidverknüpfung inseriert ist.

3. Rekombinante Nukleotidsequenz nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Oligonukleotid an den prolinreichen in Tandemanordnung wiederholten Sequenzen der Nukleotidverknüpfung inseriert ist.

4. Nukleotidsequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleotidverknüpfung für das Mais- γ -Zein codiert.

5. Nukleotidsequenz nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die für das Mais- γ -Zein codierende Nukleotidverknüpfung der in **Abb. 9** dargestellten Sequenz entspricht.

6. Nukleotidsequenz nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Oligonukleotid an der Stelle oder nach der Pro-X-Domäne oder in der Pro-X-Domäne, die im Mais- γ -Zein natürlich vorkommt, inseriert ist.

7. Rekombinante Nukleotidsequenz, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Nukleotidsequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 6 unter der Kontrolle eines ExpressionsPromotors umfaßt.

8. Rekombinante Nukleotidsequenz nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie sich bei dem Promotor um einen für ein bestimmtes Zellgewebe spezifischen Promotor, zum Beispiel um einen für die Expression in den Samenkörnern und/oder in den Blättern von Pflanzen spezifischen Promotor, handelt.

9. Nukleotidsequenz nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem ExpressionsPromotor um den des Mais- γ -Zeins handelt.

10. Nukleotidsequenz nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem ExpressionsPromotor um den CaMV35S-Promotor handelt.

11. Nukleotidsequenz nach einem der Ansprüche 6 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß sie für eines der Polypeptide P20yZ oder H45yZ, die den in [Abb. 11](#) bzw. 10 beschriebenen Sequenzen entsprechen, codiert.

12. Klonierungs- und/oder Expressionsvektor, dadurch gekennzeichnet, daß er an einer für seine Replikation nicht unbedingt erforderlichen Stelle eine Nukleotidsequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 11 umfaßt.

13. Klonierungs- und/oder Expressionsvektor, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eines der Plasmide pP20yZ (CNCMN I-1640) oder pH45yZ (CNCMNI-1639) handelt, oder dadurch, daß er ein für das in [Abb. 3](#) dargestellte Polypeptid H30yZ codierendes Oligonukleotid, umfaßt.

14. Polypeptid, das von einer Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 6 codiert wird.

15. An Lysin angereichertes modifiziertes Mais- γ -Zein, dadurch gekennzeichnet, daß es von der Nukleotidsequenz nach Anspruch 5 codiert wird.

16. An Lysin angereichertes modifiziertes Mais- γ -Zein, dadurch gekennzeichnet, daß seine Aminosäuresequenz mit mindestens einem Polypeptid der Formel $(P - K)_n$ oder der Formel $K - (P - K)_n$, in der
– n eine ganze Zahl 2 oder darüber bedeutet,
– P einen Prolin-Aminosäurerest darstellt,
– K einen Lysin-Aminosäurerest darstellt,

- das Zeichen „–“ eine Bindung zwischen den beiden Aminosäureresten, insbesondere eine peptidartige Bindung, symbolisiert, wobei die n Einheiten (P – K) untereinander ebenfalls durch solche Bindungen, zum Beispiel peptidartige Bindungen, gebunden sind, modifiziert ist, wobei das Polypeptid der Formel (P – K)_n oder K(P – K)_n so in die Aminosäuresequenz des normalen Mais-γ-Zein inseriert ist, daß
- wenn das lysinreiche modifizierte γ-Zein in einer Wirtszelle, insbesondere einer Pflanzenzelle produziert wird, es auf gleiche oder ähnliche Weise wie das normale Mais-γ-Zein, das unter den gleichen Bedingungen in der gleichen Wirtszelle produziert würde, lokalisiert ist, und/oder
- das modifizierte Mais-γ-Zein von gegen das normale Mais-γ-Zein gerichteten Antikörpern erkannt wird.

17. An Lysin angereichertes modifiziertes Mais-γ-Zein nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß durch dieses Polypeptid eine in normalem Mais-γ-Zein natürlich vorhandene prolinreiche in Tandemanordnung wiederholte Sequenz ersetzt wird.

18. An Lysin angereichertes modifiziertes Mais-γ-Zein nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß das Polypeptid unter Deletion von einer oder mehreren Aminosäuren einer prolinreichen in Tandemanordnung wiederholten Sequenz des normalen γ-Zeins inseriert ist.

19. An Lysin angereichertes modifiziertes Mais-γ-Zein nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß das Polypeptid einer prolinreichen in Tandemanordnung wiederholten Sequenz des normalen γ-Zeins hinzugefügt ist.

20. An Lysin angereichertes modifiziertes Mais-γ-Zein nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß das Polypeptid in den N- oder C-terminalen Teil der Aminosäuresequenz des normalen Mais-γ-Zeins inseriert ist.

21. Modifiziertes Mais-γ-Zein nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um das Protein P20yZ, [Abb. 11](#), oder das Protein H30yZ, [Abb. 3](#), oder das Protein H45yZ, [Abb. 10](#), handelt.

22. Rekombinante Wirtszelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Nukleotidsequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 11 umfaßt.

23. Wirtszelle nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um ein Bakterium, z.B. um E. coli oder Agrobacterium tumefaciens, handelt.

24. Wirtszelle nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine pflanzliche Zelle handelt.

25. Wirtszelle nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine Pflanzensamenzelle handelt.

26. Wirtszelle nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine Maissamen-Endospermzelle handelt.

27. Wirtszelle nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Nukleotidsequenz nach Anspruch 5 stabil in ihr Genom integriert enthält.

28. Wirtszelle nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein lysinreiches modifiziertes Mais-γ-Zein nach einem der Ansprüche 16 bis 21 produziert.

29. Wirtszelle nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine Soja-, Sonnenblumen-, Tabak-, Weizen-, Hafer-, Luzerne-, Reis-, Raps-, Arabidopsis- oder Maiszelle handelt.

30. Samen, die ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 16 bis 21 produzieren.

31. Pflanze, die ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 16 bis 21 produziert.

32. Pflanze nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um Mais handelt.

33. Samen, die ein modifiziertes Polypeptid exprimieren und die von Pflanzen nach Anspruch 31 oder 32

erhalten werden.

34. Verwendung eines Oligonukleotids, das aus der Reihe:

- a) Oligonukleotid, das mindestens eine Verknüpfung, die für ein Polypeptid der Formel $(P - K)_n$, in der
 - n eine ganze Zahl 2 oder darüber bedeutet,
 - P einen Prolin-Aminosäurerest darstellt,
 - K einen Lysin-Aminosäurerest darstellt,
 das Zeichen „-“ eine Bindung zwischen den beiden Aminosäureresten, insbesondere eine peptidartige Bindung, symbolisiert, wobei die n Einheiten $(P - K)$ untereinander ebenfalls durch solche Bindungen, zum Beispiel peptidartige Bindungen, gebunden sind, codiert, umfaßt,
 - b) Oligonukleotid gemäß a), in dem n eine ganze Zahl 3 oder darüber, vorzugsweise 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 oder 15, bedeutet,
 - c) Oligonukleotid gemäß a) oder b), in dem die Sequenz der n Einheiten (PK) durch einen oder mehrere Aminosäurereste, die von den Resten P oder K verschieden sind, unterbrochen ist,
 - d) Oligonukleotid gemäß a), b) oder c), das an seinem 5'- und/oder 3'-Ende durch ein oder mehrere Codons vervollständig ist,
 - e) Oligonukleotid gemäß a), b), c) oder d), das an seinem 5'- und/oder 3'-Ende durch einen Lysinrest am N-terminalen Ende des gebildeten Polypeptids vervollständig ist,
 - f) Oligonukleotid gemäß e), das für ein Polypeptid der Formel $(P - K)_n$, der Formel $K(P - K)_4$ oder der Formel $2K(P - K)_4$ codiert, stammt,
- zur Gewinnung eines an Lysin angereicherten Speicherproteins aus der Familie der Zeine.

35. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen oder Samen, die ein modifiziertes Speicherprotein aus der Familie der Zeine exprimieren, dadurch gekennzeichnet, daß es die folgenden Schritte umfaßt

- a) Transformation einer Pflanzenzelle mit einer Nukleotidsequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 11 oder einem Vektor nach einem der Ansprüche 12 oder 13 unter Bedingungen, die die stabile und funktionelle Expression des von der Nukleotidsequenz codierten modifizierten Speicherproteins gestatten;
- b) Regeneration von Pflanzen aus der transformierten Pflanzenzelle aus Schritt a) zur Gewinnung von Pflanzen, die das modifizierte Speicherprotein exprimieren, sowie
- c) gegebenenfalls Gewinnung von Samen von in Schritt b) gewonnenen modifizierten Pflanzen.

36. Verfahren nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Pflanze um Mais und bei dem Speicherprotein um γ -Zein handelt.

Es folgen 17 Blatt Zeichnungen

pP20 γ Z

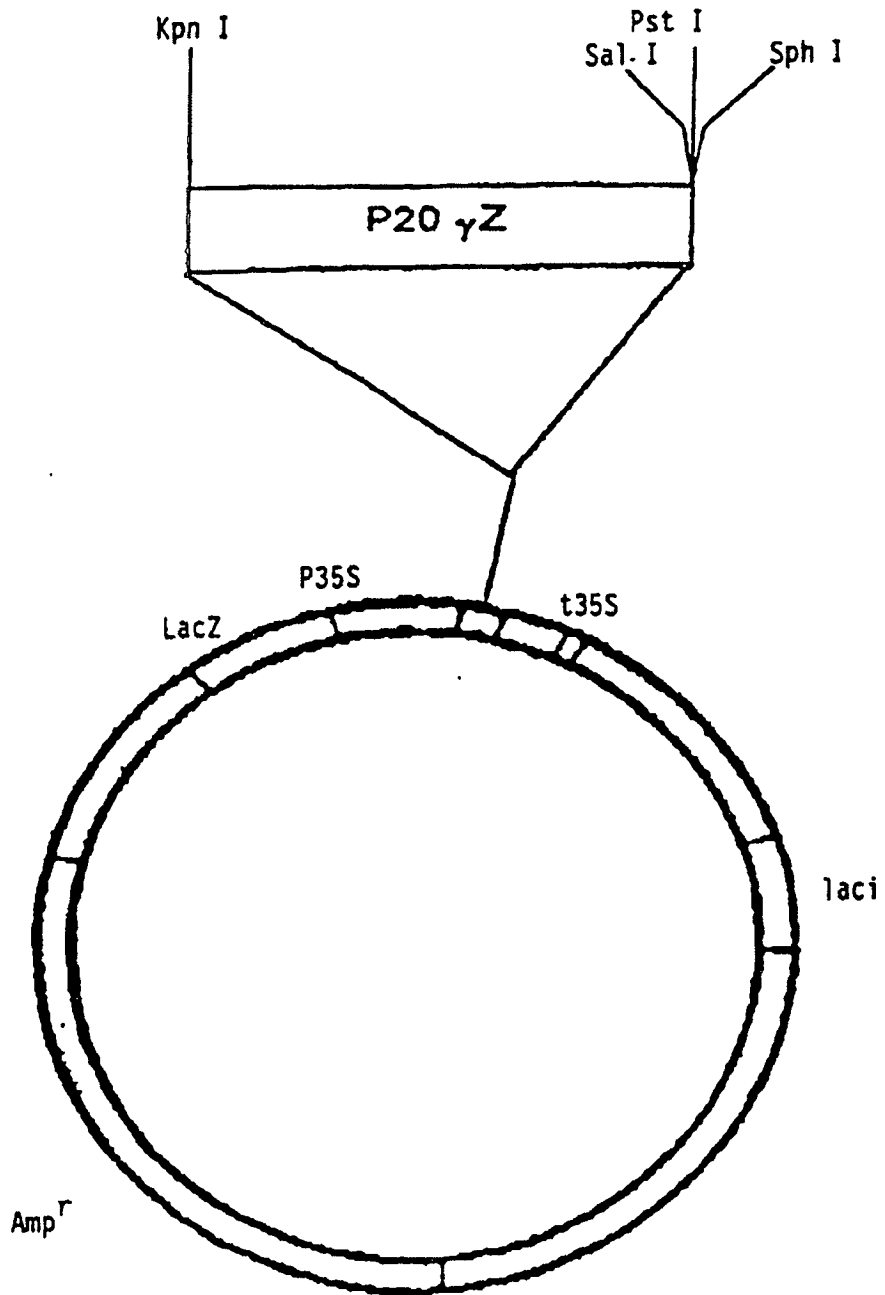


Abbildung 1

pH45 γ Z

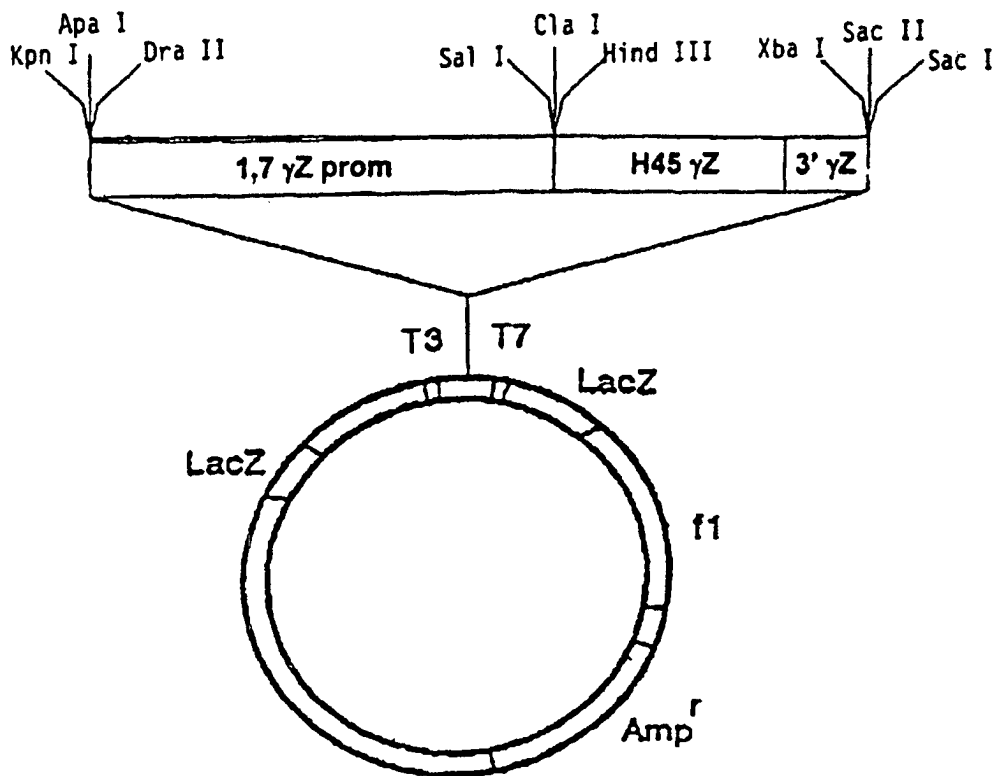


Abbildung 2

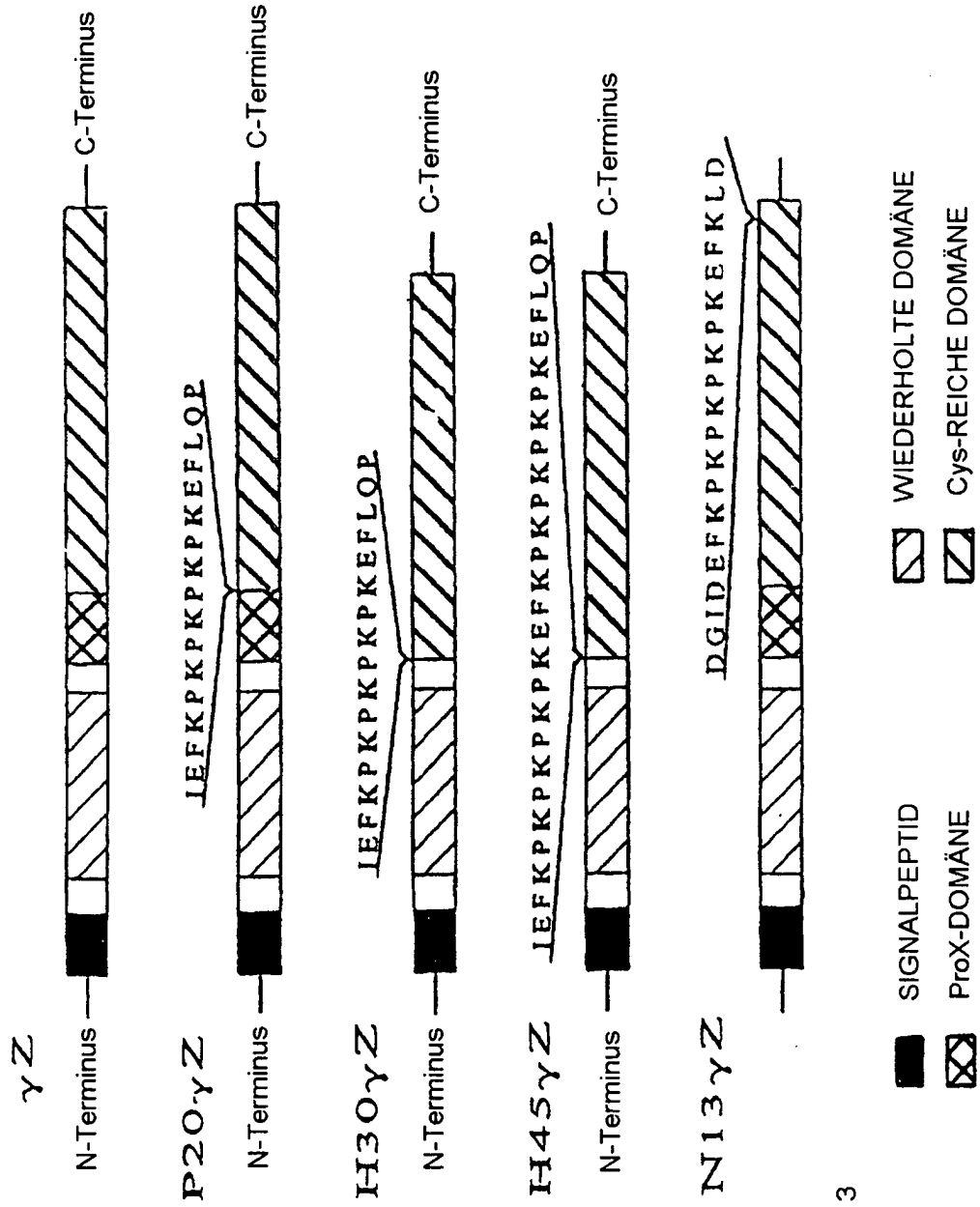


Abbildung 3

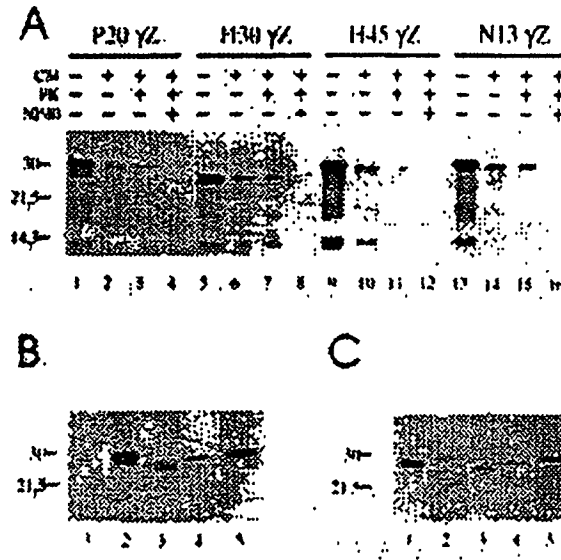


Abbildung 4

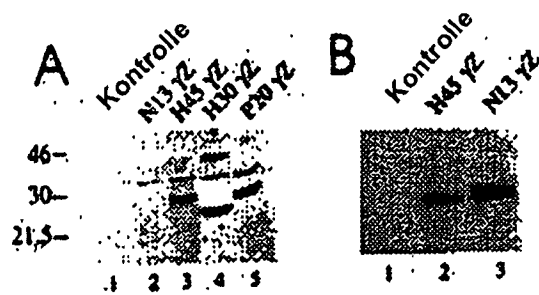


Abbildung 6

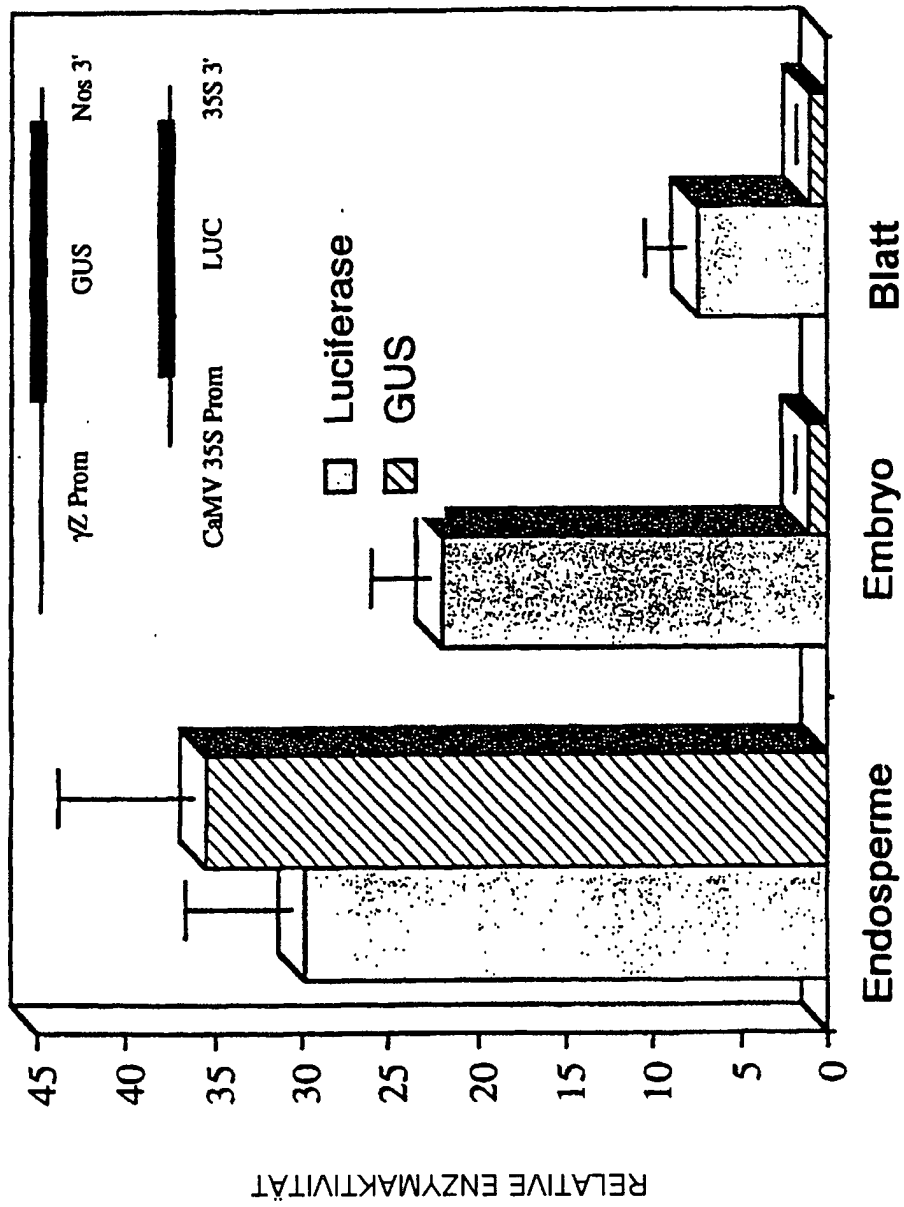


Abbildung 5

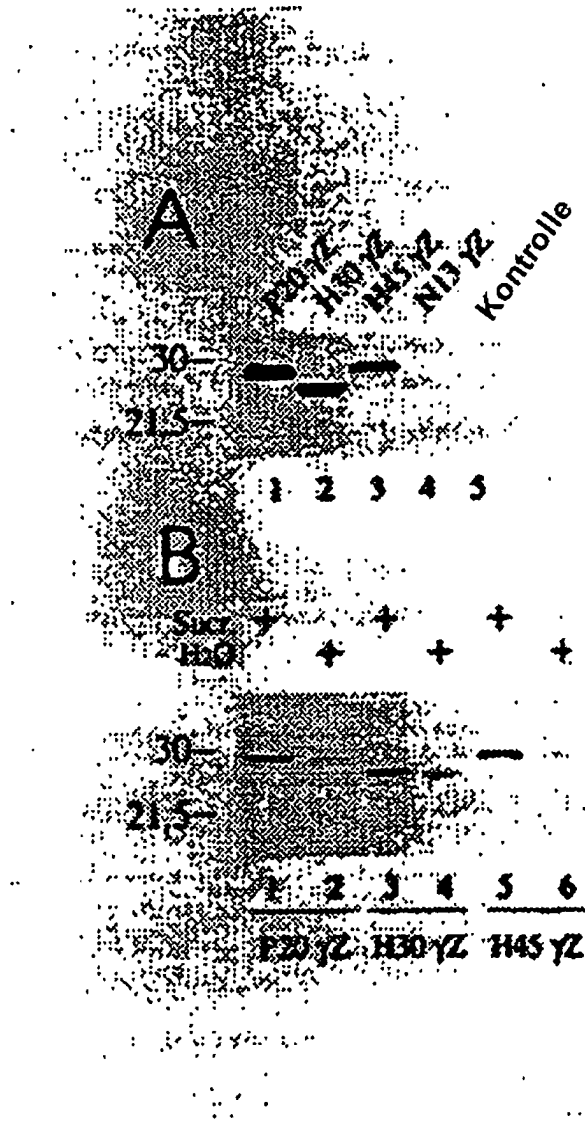


Abbildung 7

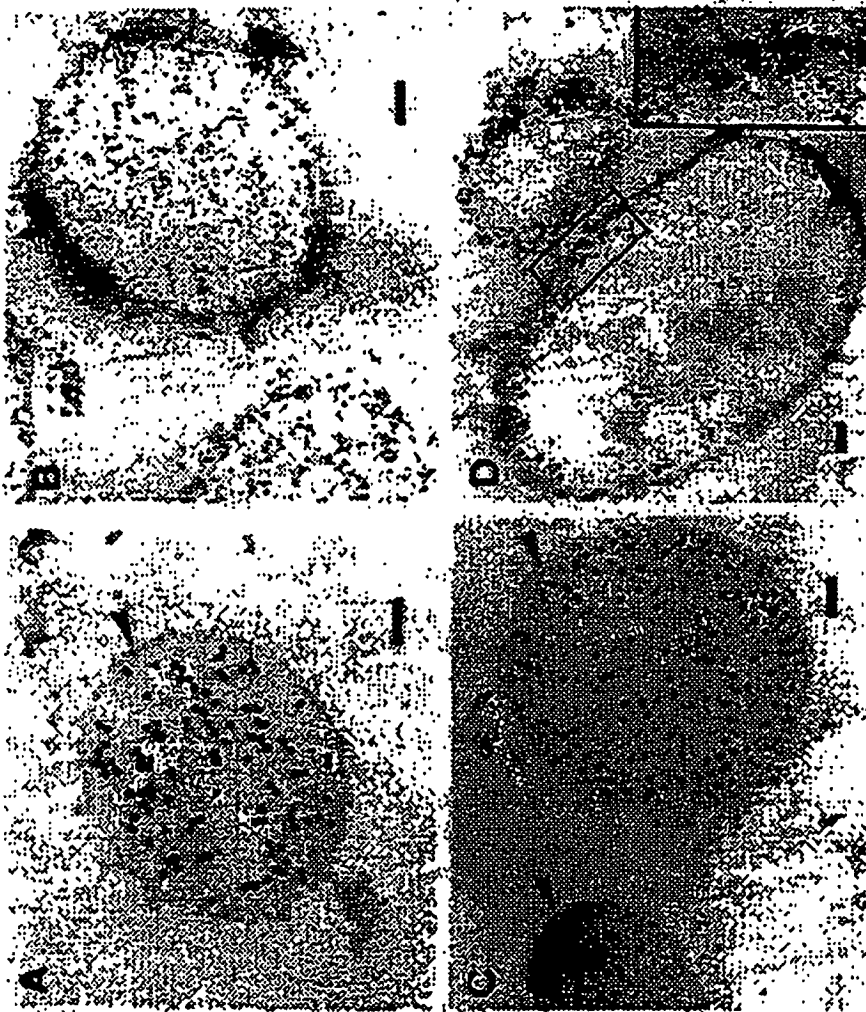


Abbildung 8

γ - Zein

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
ATGAGGGTGTGCTCGTTGCCCTCGCTCTCCTGGCTCTCGCTGCGAGCGCCACCTCCACG
M R V L L V A L A L L A L A A S A T S T

      70      80      90      100     110     120
      |      |      |      |      |      |
CATAAAGCGGGCTGCGGCTGCCAGCCACCGCCCGGTTTCATCTACCGCCGCGGTG
H T S G G C G C Q P P P P V H L P P P V

      130     140     150     160     170     180
      |      |      |      |      |      |
CATCTGCCACCTCCGGTTCACCTGCCACCTCCGGTGCATCTCCCACCGCCGGTCCACCTG
H L P P P V H L P P P V H L P P P V H L

      190     200     210     220     230     240
      |      |      |      |      |      |
CCGCCGCGGTCCACCTGCCACCGCCGGTCCATGTGCCGCGCCGGTTCATCTGCCGCGG
P P P V H L P P P V H V P P P V H L P P

      250     260     270     280     290     300
      |      |      |      |      |      |
CCACCATGCCACTACCCTACTCAACCGCCCCGGCCTCAGCCTCATCCCCAGCCACACCCA
P P C H Y P T Q P P R P Q P H P Q P H P

      310     320     330     340     350     360
      |      |      |      |      |      |
TGCCCGTGCCAACAGCCGCATCCAAGCCCGTGCCAGCTGCAGGGAACCTGCGGCGTTGGC
C P C Q Q P H P S P C Q L Q G T C G V G

      370     380     390     400     410     420
      |      |      |      |      |      |
AGCACCCCGATCCTGGGCCAGTGCCTCGAGTTTCTGAGGCATCAGTGCAGCCCGACGGCG
S T P I L G Q C V E F L R H Q C S P T A

      430     440     450     460     470     480
      |      |      |      |      |      |
ACGCCCTACTGCTCGCCTCAGTGCCAGTCGTTGCGGCAGCAGTGTGCCAGCAGCTCAGG
T P Y C S P Q C Q S L R Q Q C C Q Q L R

      490     500     510     520     530     540
      |      |      |      |      |      |
CAGGTGGAGCCGCGAGCACCGGTACCAGGCGATCTTCGGCTTGGTCCTCCAGTCCATCCTG
Q V E P Q H R Y Q A I F G L V L Q S I L

      550     560     570     580     590     600
      |      |      |      |      |      |
CAGCAGCAGCCGCAAAGCGGCCAGGTCCGCGGGGCTGTTGGCGGCGCAGATAGCGCAGCAA
Q Q Q P Q S G Q V A G L L A A Q I A Q Q

```

Abbildung 9

```

      610      620      630      640      650      660
      |      |      |      |      |      |
CTGACGGCGATGTGCGGCCTGCAGCAGCCGACTCCATGCCCCCTACGCTGCTGCCGGCGGT
L T A M C G L Q Q P T P C P Y A A A G G

      670
      |
GTCCCCCACTGA
V P H -
```

Abbildung 9 (Fortsetzung)

H45 γ Z

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
ATGAGGGTGTGCTCGTTGCCCTCGCTCTCCTGGCTCTCGCTGCGAGCGCCACCTCCACG
M R V L L V A L A L L A L A A S A T S T

      70      80      90      100     110     120
      |      |      |      |      |      |
CATAACAAGCGGGCGGCTGCGGCTGCCAGCCACCGCCGCGGTTTCATCTACCGCCGCGGGTG
H T S G G C G C Q P P P P V H L P P P V

      130     140     150     160     170     180
      |      |      |      |      |      |
CATCTGCCACCTCCGGTTCACCTGCCACCTCCGGTGCATCTCCCACCGCCGGTCCACCTG
H L P P P V H L P P P V H L P P P V H L

      190     200     210     220     230     240
      |      |      |      |      |      |
CCGCCGCGGTCCACCTGCCACCGCCGGTCCATGTGCCGCGCGGTTTCATCTGCCGCCG
P P P V H L P P P V H V P P P V H L P P

      250     260     270     280     290     300
      |      |      |      |      |      |
CCACCATGCCACTACCCTACTCAACCGCCCCGGATCGAATTCAAACCAAAGCCAAAGCCG
P P C H Y P T Q P P R I E F K P K P K P

      310     320     330     340     350     360
      |      |      |      |      |      |
AAGCCAAAAGAATTCAAACCAAAGCCAAAGCCGAAGCCAAAAGAATTCCTGCAGCCCCTG
K P K E F K P K P K P K P K E F L Q P L

      370     380     390     400     410     420
      |      |      |      |      |      |
CAGGGAACCTGCGGCGTTGGCAGCACCCCGATCCTGGGCCAGTGCCTCGAGTTTCTGAGG
Q G T C G V G S T P I L G Q C V E F L R

      430     440     450     460     470     480
      |      |      |      |      |      |
CATCAGTGCAGCCCGACGGCGACGCCCTACTGCTCGCCTCAGTGCCAGTTCGTTGCGGCAG
H Q C S P T A T P Y C S P Q C Q S L R Q

      490     500     510     520     530     540
      |      |      |      |      |      |
CAGTGTGCCAGCAGCTCAGGCAGGTGGAGCCGCGAGCACCGGTACCAGGCGATCTTCGGC
Q C C Q Q L R Q V E P Q H R Y Q A I F G

      550     560     570     580     590     600
      |      |      |      |      |      |
TTGGTCCCTCCAGTCCATCCTGCAGCAGCAGCCGCAAAGCGGCCAGGTTCGCGGGGCTGTTG
L V L Q S I L Q Q Q P Q S G Q V A G L L

      610     620     630     640     650     660
      |      |      |      |      |      |
GCGGCGCAGATAGCGCAGCAACTGACGGCGATGTGCGGCCTGCAGCAGCCGACTCCATGC
A A Q I A Q Q L T A M C G L Q Q P T P C

```

Abbildung 10

670 680 690
| | |
CCCTACGCTGCTGCCGGCGGTGTCCCCACTGA
P Y A A A G G V P H -

Abbildung 10 (Fortsetzung)

P20 γZ

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
ATGAGGGTGTGCTCGTTGCCCTCGCTCTCCTGGCTCTCGCTGCGAGCGCCACCTCCACG
M R V L L V A L A L L A L A A S A T S T

      70      80      90      100     110     120
      |      |      |      |      |      |
CATAACAAGCGGGCGGCTGCGGCTGCCAGCCACCGCCCGCGGTTTCATCTACCGCCGCGGTTG
H T S G G C G C Q P P P P V H L P P P V

      130     140     150     160     170     180
      |      |      |      |      |      |
CATCTGCCACCTCCGGTTCACCTGCCACCTCCGGTGCATCTCCCACCGCCGGTCCACCTG
H L P P P V H L P P P V H L P P P V H L

      190     200     210     220     230     240
      |      |      |      |      |      |
CCGCCCGCGGTTCCACCTGCCACCGCCGGTCCATGTGCCGCCCGCGGTTTCATCTGCCGCCG
P P P V H L P P P V H V P P P V H L P P

      250     260     270     280     290     300
      |      |      |      |      |      |
CCACCATGCCACTACCCTACTCAACCGCCCCGGCCTCAGCCTCATCCCCAGCCACACCCA
P P C H Y P T Q P P R P Q P H P Q P H P

      310     320     330     340     350     360
      |      |      |      |      |      |
TGCCCGTGCCAAACAGCCGCATCCAAGCCCGTGCCAGATCGAATTCAAACCAAAGCCAAAG
C P C Q Q P H P S P C Q I E F K P K P K

      370     380     390     400     410     420
      |      |      |      |      |      |
CCGAAGCCAAAAGAATTCTGCAGCCCCTGCAGGGAACCTGCGGCGTTGGCAGCACCCCCG
P K P K E F L Q P L Q G T C G V G S T P

      430     440     450     460     470     480
      |      |      |      |      |      |
ATCCTGGGCCAGTGCCTCGAGTTTCTGAGGCATCAGTGCAGCCCGACGGCGACGCCCTAC
I L G Q C V E F L R H Q C S P T A T P Y

      490     500     510     520     530     540
      |      |      |      |      |      |
TGCTCGCCTCAGTGCCAGTTCGTTGCGGCAGCAGTGTGCCAGCAGCTCAGGCAGGTGGAG
C S P Q C Q S L R Q Q C C Q Q L R Q V E

      550     560     570     580     590     600
      |      |      |      |      |      |
CCGCAGCACCGGTACCAGGCATCTTCGGCTTGGTCCTCCAGTCCATCCTGCAGCAGCAG
P Q H R Y Q A I F G L V L Q S I L Q Q Q

      610     620     630     640     650     660
      |      |      |      |      |      |
CCGCAAAGCGGCCAGGTGCGGGGGCTGTTGGCGGCGCAGATAGCGCAGCAACTGACGGCG
P Q S G Q V A G L L A A Q I A Q Q L T A

```

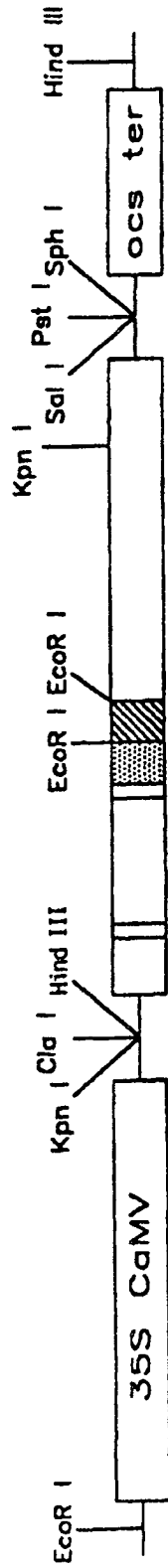
Abbildung 11

670 680 690 700 710 720
| | | | | |
ATGTGCGGCCTGCAGCAGCCGACTCCATGCCCCCTACGCTGCTGCCGGCGGTGTCCCCAC
M C G L Q Q P T P C P Y A A A G G V P H

TGA
-

Abbildung 11 (Fortsetzung)

pBin 19 P20γZ



pBin 19 H30γZ

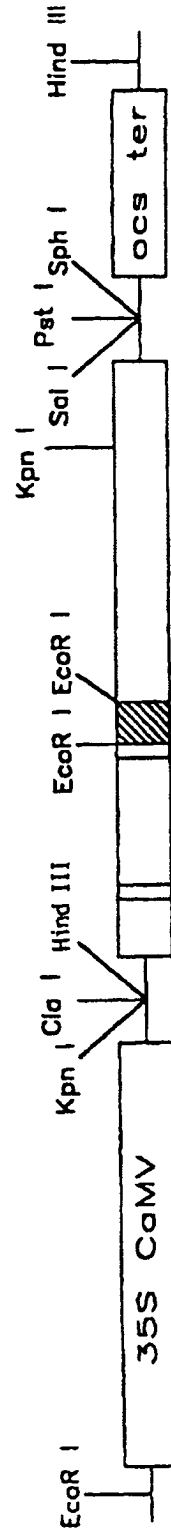


Abbildung 12

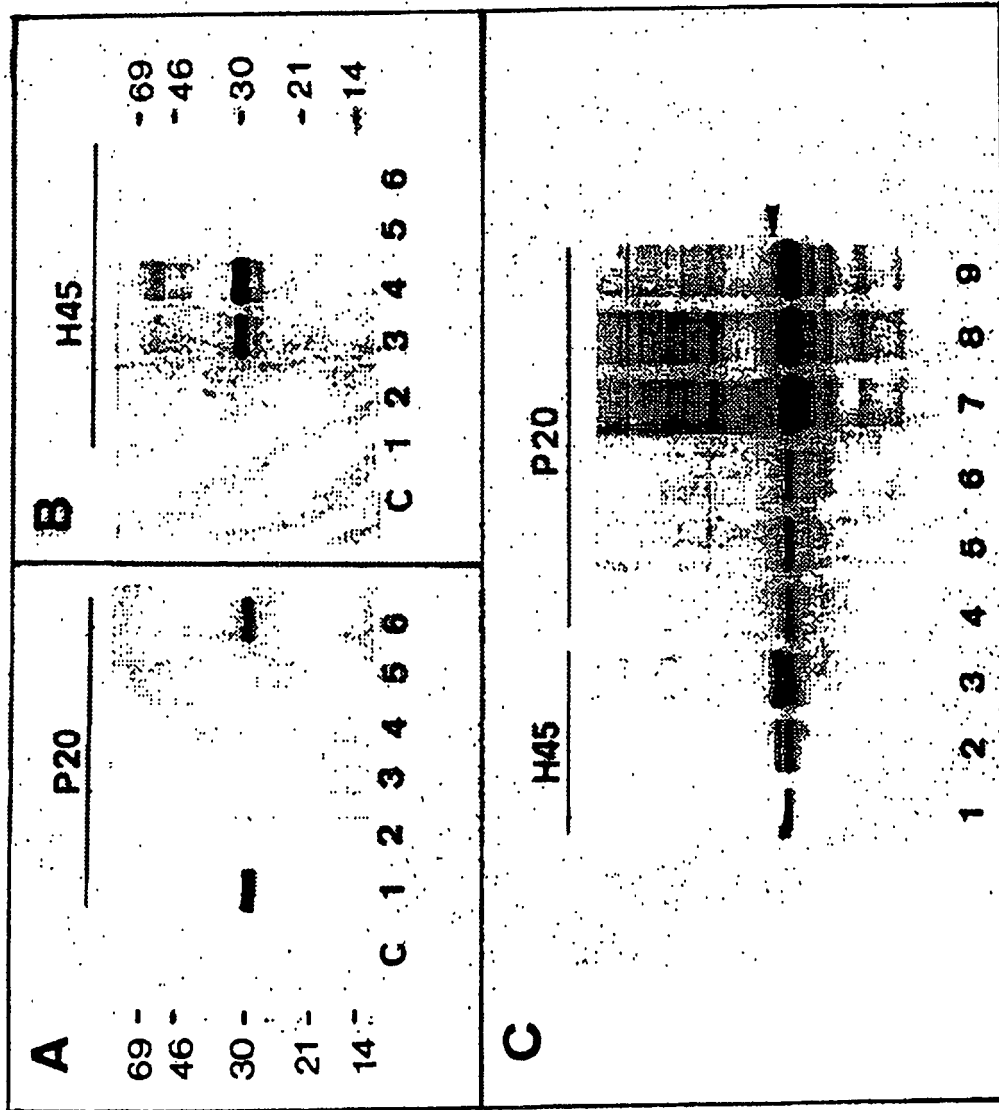


Abbildung 13

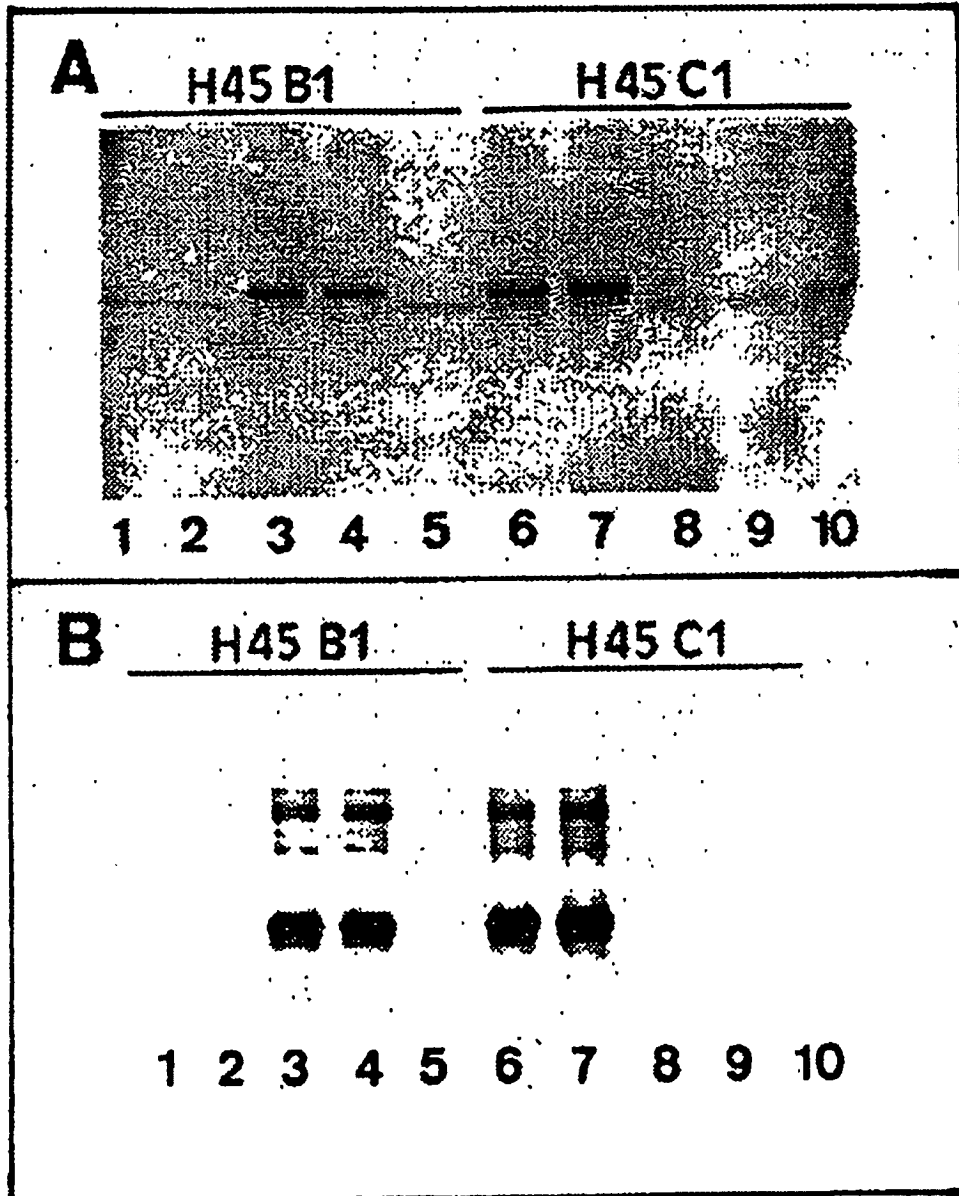


Abbildung 14

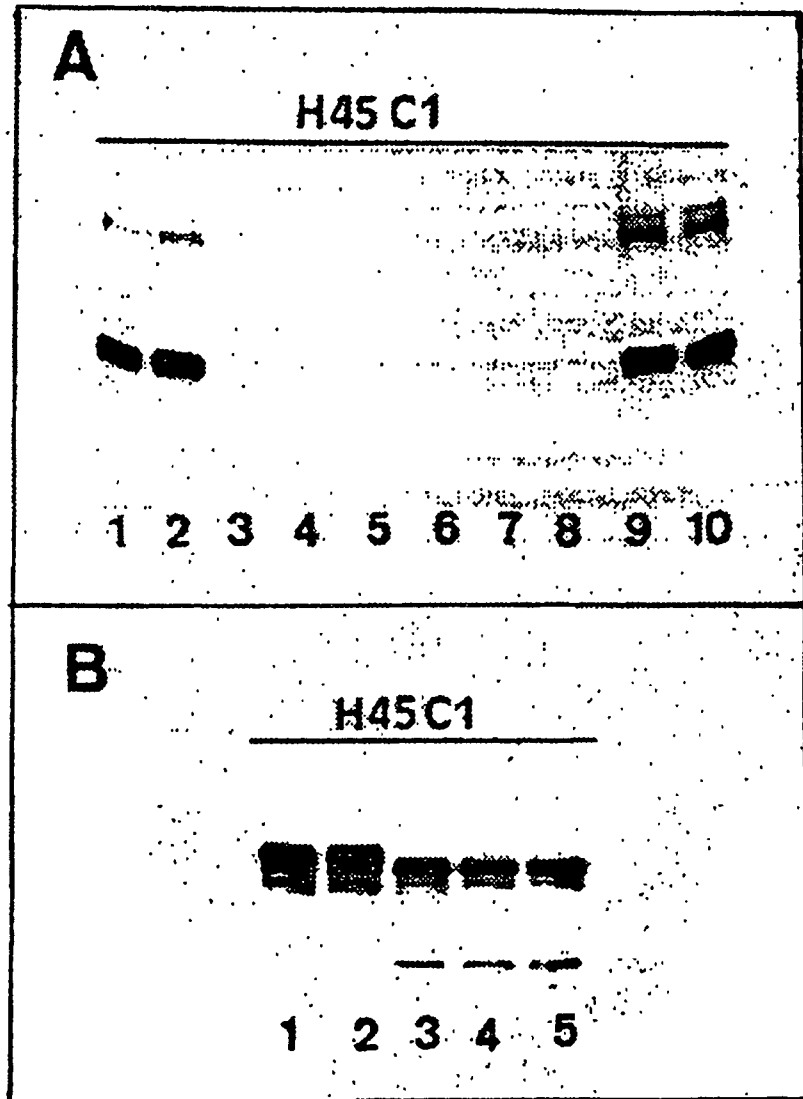


Abbildung 15