

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. Februar 2002 (07.02.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/10394 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12N 15/29**,
15/82, 15/11, 5/10, C07K 14/415, 16/16, A01H 5/00

Rebecca [DE/DE]; Geissweg 15, 72076 Tübingen (DE).
SCHUMACHER, Karin [DE/DE]; Hindenburgstrasse 55,
72127 Kusterdingen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/08379

(74) **Anwälte:** **SCHRELL, Andreas** usw.; Maybachstrasse
6A, 70469 Stuttgart (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
20. Juli 2001 (20.07.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AU, BR, CA, IL, JP, US,
ZA.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR).

(30) **Angaben zur Priorität:**
100 36 671.6 27. Juli 2000 (27.07.2000) DE

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(71) **Anmelder und**

(72) **Erfinder:** **FROMMER, Wolf-Bernd** [DE/DE]; Im Rot-
bad 18, 72076 Tübingen (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(72) **Erfinder; und**

(75) **Erfinder/Anmelder (nur für US):** **CATONI, Elisabetta**
[IT/DE]; Bergstrasse 2b, 70186 Stuttgart (DE). **SCHWAB,**

(54) **Title:** NUCLEIC ACIDS, WITH THE AID OF WHICH PLANTS HAVING AN ALTERED METABOLITE CONTENT CAN
BE PRODUCED

(54) **Bezeichnung:** NUCLEINSÄUREN, MIT DEREN HILFE PFLANZEN MIT VERÄNDERTEM METABOLIT-GEHALT ER-
ZEUGT WERDEN KÖNNEN

(57) **Abstract:** The invention relates to a nucleic acid, which codes a plant transporter of the inner mitochondrial membrane, espe-
cially a member of the mitochondrial carrier family (MCF), and to uses of this nucleic acid. The invention also relates to a fragment
of the nucleic acid, to a construct containing the nucleic acid or a fragment thereof, and to a host cell containing the nucleic acid, the
fragment or the construct. The invention additionally relates to a method for producing a transgenic plant while using the nucleic
acid, a fragment thereof or a construct that comprises the nucleic acid or a fragment thereof, and to a method for modulating the
transport properties of the inner mitochondrial membrane of a plant, of a plant part, of a plant cell and/or of seeds.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft eine Nucleinsäure, die einen pflanzlichen Transporter der inneren Mitochondri-
enmembran, insbesondere ein Mitglied der Mitochondrial Carrier-Familie (MCF) codiert, und Verwendungen dieser Nucleinsäure.
Ferner betrifft die Erfindung ein Fragment der Nucleinsäure, ein die Nucleinsäure oder ein Fragment davon enthaltendes Konstrukt
und eine die Nucleinsäure, das Fragment oder das Konstrukt enthaltende Wirtszelle. Die vorliegende Erfindung umfasst ferner ein
Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanze unter Verwendung der Nucleinsäure, eines Fragments davon oder eines die Nu-
cleinsäure oder ein Fragment davon umfassenden Konstrukts sowie ein Verfahren zur Modulation der Transporteigenschaften der
inneren Mitochondrienmembran einer Pflanze, eines Pflanzenteils, einer Pflanzenzelle und/oder von Samen.



WO 02/10394 A2

Beschreibung

Nucleinsäuren, mit deren Hilfe Pflanzen mit verändertem Metabolit-Gehalt erzeugt werden können.

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Nucleinsäure, die einen pflanzlichen oder tierischen Transporter der inneren Mitochondrienmembran, insbesondere ein Mitglied der Mitochondrial-Carrier-Familie (MCF), codiert, und ihre Verwendung zur Modifikation des mitochondrialen Transports, insbesondere in Pflanzen. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein Fragment der Nucleinsäure, ein die Nucleinsäure oder ein Fragment davon enthaltendes Konstrukt sowie eine Wirtszelle, insbesondere eine Pflanzenzelle, die die Nucleinsäure oder ein Fragment davon enthält. Die vorliegende Erfindung umfasst ferner eine transgene Pflanze, Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanze sowie Verfahren zur Modifikation der Transporteigenschaften der inneren Mitochondrienmembran einer Pflanze, insbesondere eines Pflanzenteils.

Transporter spielen in der Funktion eines Organismus eine besondere Rolle. Sie entscheiden über die Aufnahme oder Abgabe eines Stoffes in eine oder aus einer Zelle beziehungsweise einem Organismus und steuern so den Transport und die Verteilung der Stoffe zwischen den Zellen. Auf der Ebene der intrazellulären Stoffverteilung kommt den Transportern der Organellen-Membranen eine wichtige regulatorische Funktion zu, da häufig einzelne Schritte

- 2 -

eines Stoffwechselweges in verschiedenen Kompartimenten ablaufen und die Intermediate zwischen diesen Kompartimenten transportiert werden müssen.

Besonders wichtige Kompartimente stellen die auch als Kraftwerke der Zelle bezeichneten Mitochondrien dar. Neben den Prozessen der Respiration und Photorespiration findet auch eine Vielzahl anabolischer und katabolischer Schritte verschiedener Stoffwechselwege in den Mitochondrien statt. Der Citratzyklus, der als zentrale Drehscheibe den Fluss der Kohlenstoffgrundgerüste für eine Vielzahl von Metaboliten kontrolliert, ist ebenfalls in den Mitochondrien lokalisiert. Es ist daher offensichtlich, dass eine Vielzahl von Metaboliten, wie zum Beispiel Pyruvat, Aminosäuren, Carbonsäuren und Fettsäuren, in die Mitochondrien hinein und aus ihnen heraus transportiert werden muss. Im Gegensatz zur äußeren Mitochondrienmembran, die für viele Substanzen frei passierbar ist, verfügt die innere Mitochondrienmembran über Transportsysteme hoher Spezifität. Eine Reihe dieser Transportsysteme umfasst Carrier, die nach dem Prinzip des Gegentausches (Antiport) arbeiten. Als Beispiele seien hier der Adenylnucleotid-Carrier, der exogenes ADP gegen internes ATP austauscht, der Dicarbonsäure-Carrier, der Malat gegen 2-Oxoglutarat tauscht und der Tricarbonsäure-Carrier, der Citrat gegen Malat austauscht, genannt. Andere Substanzen, wie Glutamat und Aspartat, werden ohne Gegentausch (Uniport) transportiert, während für einige andere Metabolite der genaue Transportmechanismus noch nicht bekannt ist. Die Transportsysteme der inneren Mitochondrienmembran ermöglichen den Metaboliten-Austausch

und sind somit essentiell für die Integration des cytosolischen und des mitochondrialen Kompartiments. Die Mehrzahl der bislang vor allem in Hefe und in tierischen Systemen auf molekularer Ebene identifizierten Transporter der inneren Mitochondrienmembran gehören der "mitochondrial carrier"-Familie (MCF) an, die durch ihre konservierte Proteinstruktur und die Präsenz einer definierten Signatursequenz ("mitochondrial energy transfer sequence") gekennzeichnet ist (Palmieri, FEBS Letters, 346 (1994), 48-54). Aufgrund phylogenetischer Analysen werden die MCF-Vertreter in insgesamt 17 Subfamilien unterteilt, wobei bislang nur für 5 Unterfamilien Substrate bekannt sind (Moualij et al., Yeast 13 (1997), 573-581).

Auch in höheren Pflanzen scheint eine große Familie kerncodierter Gene Vertreter dieser Proteinklasse zu codieren. Bislang wurden jedoch nur der ADP/ATP-Translokator bei einer Reihe von Pflanzenarten und der Malat/2-Oxoglutarat Translokator aus *Panicum* isoliert und charakterisiert. Interessanterweise ist auch der vom brittle-1 Gen von Mais codierte plastidäre Adenylat-Translokator ein MCF-Mitglied. Eine Analyse dieser Proteinfamilie in höheren Pflanzen kann daher nicht nur der Erforschung des mitochondrialen Transports, sondern auch des plastidären Transports dienen (Sullivan et al., Plant Cell, 3 (1991), 1337-48; Shannon et al., Plant Physiol., 117 (1998), 1235-52).

Durch die Analyse der Hefe-Mutanten *arg11* (Crabeel et al., J. Biol. Chem., 271 (1996), 25011-25018) und *acr1* (Palmieri et al., FEBS Lett., (1997), 114-

118) wurden zwei MCF-Mitglieder identifiziert, die als Transporter für Arginin/Ornithin beziehungsweise für Succinat/Fumarat fungieren.

Biosynthese und Abbau der Aminosäure Arginin finden unter Mitwirkung mitochondrialer und cytosolischer Enzyme statt, so dass sowohl Arginin selbst als auch seine Vorstufe Ornithin die innere Mitochondrienmembran passieren müssen. Die *arg11*-Mutante der Hefe wurde als Arginin-auxotrophe Mutante isoliert, das heißt, sie ist nicht in der Lage, auf Medium ohne Arginin zu wachsen. Die Clonierung des *ARG11*-Gens und die biochemische Charakterisierung seines Genprodukts haben gezeigt, dass es sich um ein MCF-Mitglied handelt, welches sowohl Ornithin als auch Arginin transportieren kann. In höheren Pflanzen stellt die Aminosäure Arginin aufgrund ihres hohen Stickstoffgehalts eine bevorzugte Speicherform für Stickstoff dar. So liegen in den Keimblättern der Soja-Bohne 60% des in Form von freien Aminosäuren vorliegenden Stickstoffs und 18% des in Samen-Proteinen enthaltenen Stickstoffs als Arginin vor. Die Identifizierung intrazellulärer Transporter, insbesondere des mitochondrialen Arginin-Transporters, ist die Voraussetzung dafür, um gezielte Veränderungen des Proteingehalts und/oder der Proteinzusammensetzung von Nutzpflanzen durchführen zu können.

Der in den Mitochondrien stattfindende Citrat-Zyklus steht im Zentrum des Stoffwechsels aller Organismen. Die aus dem Citrat-Zyklus als biosynthetische Vorstufen entfernten Intermediate müssen durch sogenannte anaplerotische Reaktionen aufge-

füllt werden. Der im Cytosol beziehungsweise in den Glyoxisomen ablaufende Glyoxylat-Zyklus stellt sowohl in Hefe als auch in Pflanzen die wichtigste anaplerotische Reaktion dar, da das aus dieser Reaktion hervorgehende Succinat zur Auffüllung des Citrat-Zyklus genutzt wird. Hierzu muss Succinat jedoch zunächst aus dem Cytosol in die Mitochondrien transportiert werden. In Hefe wird dieser Transport vom ACR1-Protein, bei dem es sich ebenfalls um ein MCF-Mitglied handelt, bewerkstelligt. In Abwesenheit von ACR1 können Hefezellen nicht auf Acetat oder Ethanol als einziger Kohlenstoffquelle wachsen, da das aus ihrem Abbau entstehende Succinat nicht in die Mitochondrien gelangt. In Pflanzen stellt der Transport von Succinat in die Mitochondrien einen entscheidenden Schritt bei der Mobilisierung des in Form von Fettsäuren gespeicherten Kohlenstoff dar. Das aus der β -Oxidation stammende Acetyl-CoA wird in den Glyoxisomen zu Succinat umgewandelt, welches dann in den Citrat-Zyklus eingeschleust werden kann. Die Effizienz und Geschwindigkeit, mit der die gespeicherte Energie mobilisiert werden kann, ist insbesondere bei der Keimung fettspeichernder Pflanzensamen von zentraler Bedeutung. Bei Pflanzen können Manipulationen des Transports von Succinat in die Mitochondrien daher zu einer gezielten Veränderung des Keimungsverhaltens eingesetzt werden.

Der vorliegenden Erfindung liegt das technische Problem zu Grunde, Verfahren und Mittel zur Identifizierung und/oder Isolierung pflanzlicher oder tierischer Transporter der inneren Mitochondrienmembran, insbesondere pflanzlicher MCF-Mitglieder,

sowie auf diesen Verfahren und Mitteln basierende weitere Verfahren und Mittel bereitzustellen, um Pflanzen im Hinblick auf einen modifizierten mitochondrialen Transport von Stoffwechselmetaboliten und gegebenenfalls auch einen modifizierten plastidären Transport von Stoffwechselprodukten gezielt verändern zu können. Die gezielte Veränderung des mitochondrialen Transports betrifft in bevorzugter Ausführung insbesondere den Arginin-Transport bei Nutzpflanzen, um deren Proteingehalt und/oder deren Proteinzusammensetzung gezielt zu modifizieren, und den Transport von Succinat, um das Keimungsverhalten von Pflanzen gezielt zu modifizieren.

Erfindungsgemäß wurde das technische Problem gelöst, indem Gene, codierend Transporter der inneren Mitochondrienmembran, insbesondere pflanzliche MCF-Mitglieder, und die von ihnen codierten Proteine durch Komplementation der Hefe-Mutanten *arg11* und *acr1* identifiziert und charakterisiert wurden. Dabei wurde erstmalig gezeigt, dass ein pflanzliches Protein der inneren Mitochondrienmembran auch in Hefe korrekt lokalisiert wird, das heißt seinen Bestimmungsort erreicht. Erfindungsgemäß wird eine, vorzugsweise isolierte und vollständig gereinigte Nucleinsäure bereitgestellt, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- a) einer Nucleinsäure, die erhältlich ist durch Komplementation MCF-defizienter Wirtszellen mit Nucleinsäuresequenzen einer pflanzlichen oder tierischen Genbank und Selektion MCF-positiver Wirtszellen, oder einem Fragment davon;

-7-

- b) einer Nucleinsäure mit einer in SEQ ID Nr. 1 oder in SEQ ID Nr. 3 dargestellten Nucleotidsequenz oder einem Fragment davon;
- c) einer Nucleinsäure mit einer Sequenz, die ein Protein mit einer in SEQ ID Nr. 2 oder in SEQ ID Nr. 4 dargestellten Sequenz codiert, oder einem Fragment davon;
- d) einer Nucleinsäure, die zu einer Nucleinsäure nach a) bis c) komplementär ist, oder einem Fragment davon;
- e) einer Nucleinsäure, die durch Substitution, Addition, Inversion und/oder Deletion einer oder mehrerer Basen einer Nucleinsäure nach a) bis d) erhältlich ist; und
- f) einer Nucleinsäure, die aufgrund der Degeneration des genetischen Codes mit einer Nucleinsäure nach a) bis e) oder einem Fragment davon hybridisiert.

Eine Nucleinsäure kann eine DNA-Sequenz, zum Beispiel cDNA oder genomische DNA-Sequenz, oder eine RNA-Sequenz, zum Beispiel mRNA-Sequenz sein.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bedeuten die Begriffe "MCF-Mitglied" und "MCF-Protein" ein Protein mit MCF-Aktivität, das heißt ein Protein, das an dem Transport von Metaboliten durch die innere Mitochondrienmembran, gegebenenfalls auch durch die innere Plastidenmembran, beteiligt ist und das die typischen Merkmale dieser Proteinfamilie aufweist. Bei den typischen Merkmalen han-

delt es sich zum einen um die Primärstruktur, die aus einer dreifachen Wiederholung einer circa 100 Aminosäuren umfassenden Domäne mit je zwei Membranspannen besteht, sowie um das Vorliegen von bis zu drei Wiederholungen der sogenannten "mitochondrial energy transfers"-Signatur (P-X-(D/E)-X-(LIVAT)-(RK)-X-(LRH)-(LIVMFY). Die Begriffe "MCF-Mitglied" und "MCF-Protein" umfassen im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung insbesondere Transportermoleküle für Arginin/Ornithin und Transportermoleküle für Succinat/Fumarat. Zum Nachweis der Transporter-Aktivität kann beispielsweise das von Palmieri et al. (FEBS Letters, 417 (1997), 447) beschriebene Verfahren eingesetzt werden.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bedeuten "MCF-defiziente Zellen" oder "MCF-defiziente Wirtszellen" Zellen, die aufgrund eines oder mehrerer genetischer Defekte negativ veränderte mitochondriale Transporteigenschaften aufweisen, die zu einem negativ selektierbaren Phänotyp führen. Bei MCF-defizienten Pflanzenzellen kann gegebenenfalls auch der plastidäre Transport negativ verändert sein.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bedeuten "MCF-positive Zellen oder Wirtszellen" daher Zellen, die entweder natürlicherweise eine ein MCF-Mitglied codierende Nucleinsäure enthalten, oder Zellen, die aufgrund einer Komplementation MCF-negativer Zellen eine Nucleinsäure enthalten, die den/die dem negativ veränderten mitochondrialen Transport zu Grunde liegenden genetischen De-

fekts/Defekte zumindest teilweise aufhebt, und die daher einen positiv selektierbaren Phänotyp zeigen.

Der in der vorliegenden Erfindung verwendete Begriff "Komplementation" bezeichnet eine sich im Phänotyp eines Organismus widerspiegelnde Kompensation eines genetischen Funktionsdefektes unter Beibehaltung der dem Defekt zu Grunde liegenden Mutation(en). Eine Komplementation im Zusammenhang mit der Erfindung liegt beispielsweise vor, wenn ein genetischer Defekt in einem MCF-Gen (zum Beispiel im ARG11-Gen von *Saccharomyces cerevisiae*) durch die Anwesenheit eines gleichartigen, intakten Gens (zum Beispiel des AtARG11-Gens aus *Arabidopsis thaliana*) aufgehoben wird, wobei das intakte Gen die Funktion des defekten MCF-Gens übernimmt.

Erfindungsgemäß werden in bevorzugten Ausführungsformen MCF-defiziente Zellen oder Wirtszellen zur Isolierung und Identifizierung von Nucleinsäuren verwendet, die ein MCF-Mitglied, insbesondere ein Transportermolekül für Arginin/Ornithin oder ein Transportermolekül für Succinat/Fumarat codieren. Bevorzugte MCF-defiziente Wirtszellen sind eukaryontische Zellen, beispielsweise pflanzliche oder tierische Zellen, vorzugsweise Hefezellen. Die erfindungsgemäße Identifizierung eines MCF-Mitglieds erfolgt durch Komplementation spezifischer Mutationen in MCF-defizienten Wirtszellen, insbesondere spezifischen Mutanten der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dabei werden Nucleinsäuresequenzen einer pflanzlichen oder tierischen Genbank, zum Beispiel einer cDNA-Bank oder genomischen Bank, in MCF-defiziente Wirtszellen transformiert

und anschließend erfolgt eine Selektion auf MCF-positive Wirtszellen.

Zur Isolierung eines Gens, das ein spezifisches Transportermolekül codiert, sind geeignete Hefe-Mutanten erforderlich, die aufgrund eines Defektes in diesem Transportermolekül nicht in der Lage sind, eine bestimmte Substanz in die Mitochondrien zu transportieren. Von Delforge et al. (Eur. J. Biochem., 57 (1975), 231) ist beispielsweise die Mutante *arg11* (Stamm MG409) beschrieben, die nur in Medien wachsen kann, die die Aminosäure Arginin enthalten. Zur Durchführung der Komplementation mit pflanzlichen oder tierischen Genen wurde in dieser Mutante zusätzlich das URA3-Gen zerstört, wobei eine Uracil-Auxotrophie erzeugt wurde (MG409ura3⁻, 1c1636d). Das heißt, dass diese Mutante zum Wachstum außerdem Uracil benötigt.

Zur Bereitstellung einer erfindungsgemäßen Nucleinsäure wird eine geeignete Hefemutante, beispielsweise die *arg11/ura3*-Mutante, mit zur Verwendung in Hefe geeigneten Expressions-Plasmiden transformiert, die cDNA-Fragmente aus einer pflanzlichen oder tierischen cDNA-Genbank enthalten. Sequenzen, die pflanzliche oder tierische mitochondriale Transportermoleküle codieren, lassen sich durch Selektion von Transformanten identifizieren, die aufgrund der Expression dieser pflanzlichen oder tierischen cDNA-Sequenzen auf Medium ohne Arginin wachsen können. Erfindungsgemäß können auch Nucleinsäuren, die Proteine mit Sequenzhomologie zu bereits bekannten mitochondrialen Transportermolekülen codieren, in geeignete Hefe-Expressionsplas-

mide cloniert und auf ihre Fähigkeit zur Komplementation spezifischer Mutationen getestet werden. Die Erfindung betrifft also auch die vorstehend beschriebenen Verfahren zur Identifizierung und/oder Isolierung von Nucleinsäuren, die ein Protein mit der Aktivität eines MCF-Proteins codieren, wobei MCF-defiziente Wirtszellen mit Nucleinsäuresequenzen einer pflanzlichen oder tierischen Genbank transformiert, MCF-positive Wirtszellen selektiert und die in den positiven Wirtszellen vorhandenen MCF-codierenden Nucleinsäuren mittels herkömmlicher Verfahren isoliert und/oder identifiziert werden.

Unter Verwendung der *arg11/ura3*-Hefemutante und geeigneter Expressions-Plasmide, die den Promoter der Protonen-ATPase PMA1 aus Hefe enthalten, wurden cDNA-Clone aus *Arabidopsis thaliana* isoliert, die eine Komplementation der Hefe-Mutation bewirken. Eine Analyse unter Verwendung von Sequenzierungs- und Restriktionsverfahren sowie weiterer biochemisch-molekularbiologischer Verfahren zeigte, dass diese erfindungsgemäß isolierten *Arabidopsis thaliana*-cDNA-Fragmente pflanzliche MCF-Mitglieder codieren. Die Nucleinsäuresequenzen dieser cDNA-Clone sind in SEQ ID Nr. 1 und SEQ ID Nr. 3 gezeigt und die entsprechenden Aminosäuresequenzen dieser cDNA-Clone sind in SEQ ID Nr. 2 und SEQ ID Nr. 4 beschrieben.

Die Erfindung umfasst auch modifizierte Nucleinsäuren, die beispielsweise durch Substitution, Addition, Inversion und/oder Deletion einer oder mehrerer Basen einer erfindungsgemäßen Nucleinsäure, insbesondere innerhalb der codierenden Sequenz

einer Nucleinsäure, erhältlich sind, das heißt also auch Nucleinsäuren, die als Mutanten, Derivate oder funktionellen Äquivalente einer erfindungsgemäßen Nucleinsäure bezeichnet werden können. Solche Manipulationen der Sequenzen werden beispielsweise durchgeführt, um die von einer Nucleinsäure codierte Aminosäuresequenz gezielt zu verändern, beispielsweise zur Veränderung der Spezifität eines mitochondrialen Transporters. Nucleinsäuren, die veränderte mitochondriale Transporter codieren, können unter anderem zur Transformation landwirtschaftlich genutzter Pflanzen verwendet werden, um transgene Pflanzen herzustellen. Gezielte Sequenzveränderungen können auch dem Ziel dienen, innerhalb der Nucleinsäuresequenz geeignete Restriktionsschnittstellen bereitzustellen oder nicht erforderliche Nucleinsäuresequenzen oder Restriktionsschnittstellen zu entfernen. Dabei werden die erfindungsgemäßen Nucleinsäuren in Plasmiden inseriert und mittels Standardverfahren der Mikrobiologie/Molekularbiologie einer Mutagenese oder einer Sequenzveränderung durch Rekombination unterzogen. Zur Erzeugung von Insertionen, Deletionen oder Substitutionen, wie Transitionen und Transversionen, sind beispielsweise Verfahren zur in vitro-Mutagenese, "primer repair"-Verfahren sowie Restriktions- und/oder Ligationsverfahren geeignet (vgl. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA). Sequenzveränderungen lassen sich auch durch Anlagerung natürlicher oder synthetischer Nucleinsäuresequenzen erreichen. Beispiele für synthetische Nucleinsäuresequenzen sind Adaptoren oder Linker, die u.a. auch zur Verknüp-

fung von Nucleinsäure-Fragmenten an diese Fragmente angefügt werden.

Die vorliegende Erfindung umfasst auch Nucleinsäuren, die mit einer der vorstehend beschriebenen Nucleinsäuren nach a) bis e) hybridisieren. Der im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendete Ausdruck "Nucleinsäure, die mit einer Nucleinsäure nach a) bis e) hybridisiert" bedeutet eine Nucleinsäure, die unter mäßig stringenten Bedingungen mit einer Nucleinsäure nach a) bis e) hybridisiert. Beispielsweise kann die Hybridisierung mit einer radioaktiven Gensonde in einer Hybridisierungslösung (25% Formamid; 5 x SSPE; 0,1% SDS; 5 x Denhardt-Lösung; 50 µg/ml Heringssperma-DNA; bezüglich Zusammensetzung der Einzelkomponenten vgl. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA) 20 Stunden bei 37°C erfolgen. Anschließend wird unspezifisch gebundene Sonde durch mehrfaches Waschen der Filter in 2 x SSC/0,1% SDS bei 42°C entfernt. Vorzugsweise werden die Filter mit 0,5 x SSC/0,1% SDS, besonders bevorzugt mit 0,1 x SSC/0,1% SDS bei 42°C gewaschen.

Die vorliegende Erfindung umfasst ebenfalls Nucleinsäuren, die ein Polypeptid oder Protein mit MCF-Aktivität codieren, dessen Sequenz mindestens 40%, vorzugsweise mindestens 60%, besonders bevorzugt mindestens 80% Homologie zu einem Polypeptid oder Protein aufweist, das von einer Nucleinsäure mit einer in SEQ ID Nr. 1 oder in SEQ ID Nr. 3 dargestellten Sequenz codiert wird.

Im Zusammenhang mit der Erfindung bezieht sich der Ausdruck "mindestens 40%, vorzugsweise mindestens 60%, besonders bevorzugt mindestens 80% Homologie" auf eine Sequenzübereinstimmung auf der Aminosäuresequenz-Ebene, die mit Hilfe bekannter Verfahren, zum Beispiel computergestützter Sequenzvergleiche (Basic local alignment search tool, S. F. Altschul et al., J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410), bestimmt werden kann.

Der dem Fachmann bekannt Ausdruck "Homologie" bezeichnet den Grad der Verwandtschaft zwischen zwei oder mehreren Polypeptid-Molekülen, der durch die Übereinstimmung zwischen den Sequenzen bestimmt wird, wobei Übereinstimmung sowohl eine identische Übereinstimmung als auch einen konservativen Aminosäure-Austausch bedeuten kann. Der Prozentsatz der "Homologie" ergibt sich aus dem Prozentsatz übereinstimmender Bereiche in zwei oder mehr Sequenzen unter Berücksichtigung von Lücken oder anderen Sequenzbesonderheiten.

Der Begriff "konservativer Aminosäure-Austausch" bedeutet den Austausch eines Aminosäurerestes gegen einen anderen Aminosäurerest, wobei dieser Austausch nicht zu einer Änderung der Polarität oder Ladung an der Position der ausgetauschten Aminosäure führt. Ein Beispiel für einen konservativen Aminosäure-Austausch ist der Austausch eines unpolaren Aminosäurerestes gegen einen anderen unpolaren Aminosäurerest. Konservative Aminosäure-Austausche im Zusammenhang mit der Erfindung umfassen beispielsweise:

- 15 -

G=A=S, I=V=L=M, D=E, N=Q, K=R, Y=F, S=T
G=A=I=V=L=M=Y=F=W=P=S=T.

Die Homologie zwischen miteinander verwandten Polypeptid-Molekülen kann mit Hilfe bekannter Verfahren bestimmt werden. In der Regel werden spezielle Computerprogramme mit den besonderen Anforderungen Rechnung tragenden Algorithmen eingesetzt. Bevorzugte Verfahren zur Bestimmung der Homologie erzeugen zunächst die größte Übereinstimmung zwischen den untersuchten Sequenzen. Computerprogramme zur Bestimmung der Homologie zwischen zwei Sequenzen umfassen, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, das GCG-Programmpaket, einschließlich GAP (Dereux, J., et al., Nucleic Acids Research, 12 (12) (1984), 387; Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison (WI)); BLASTP, BLASTN und FASTA (S. Altschul et al., J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410). Das BLASTX Programm kann vom National Centre for Biotechnology Information (NCBI) und aus weiteren Quellen bezogen werden (Altschul S., et al., BLAST Handbuch, NCB NLM NIH Bethesda MD 20894; Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410). Auch der bekannte Smith Waterman-Algorithmus kann zur Bestimmung der Homologie verwendet werden.

Bevorzugte Parameter für den Sequenz-Vergleich umfassen beispielsweise:

Algorithmus: Needleman und Wunsch, J. Mol. Biol 48 (1970), 443-453;

- 16 -

Vergleichsmatrix: BLOSUM 62 von Henikoff und Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 (1992), 10915-10919;

Lücken-Wert (Gap Penalty): 12

Lückenlängen-Wert (Gap Length Penalty): 4

Schwellenwert der Ähnlichkeit: 0

Auch das GAP-Programm eignet sich zur Verwendung der vorstehend beschriebenen Parameter. Bei den vorstehend beschriebenen Parameter handelt es sich um Standardparameter (default parameters) für Aminosäuresequenz-Vergleiche.

Darüber hinaus lassen sich weitere Algorithmen, Lücken-Öffnungs-Werte (gap opening penalties), Lückenausdehnungs-Werte (gap extension penalties) und Vergleichsmatrizen einschließlich der im Programm-Handbuch, Wisconsin-Paket, Version 9 (September 1997) beschriebenen verwenden. Die Auswahl der Programme hängt sowohl von dem durchzuführenden Vergleich als auch davon ab, ob der Vergleich zwischen Sequenzpaaren durchgeführt wird, wobei GAP oder Best Fit bevorzugt sind, oder zwischen einer Sequenz und einer umfangreichen Sequenz-Datenbank, wobei FASTA oder BLAST bevorzugt sind.

Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls ein, vorzugsweise isoliertes und vollständig gereinigtes, Protein, das durch Expression einer erfindungsgemäßen Nucleinsäure oder eines Fragments davon in einer Wirtszelle erhältlich ist. Vorzugsweise besitzt das Protein die gleichen Transportei-

- 17 -

genschaften wie das Protein, das von einer Nucleinsäure mit einer in SEQ ID Nr. 1 oder in SEQ ID Nr. 3 dargestellten Sequenz codiert wird. Zum Nachweis der Aktivität eines solchen Proteins können beispielsweise Aufnahmeexperimente durchgeführt werden, wie nachfolgend im Ausführungsbeispiel beschrieben.

Die vorliegende Erfindung umfasst auch isolierte und vollständig gereinigte monoclonale oder polyclonale Antikörper oder deren Fragmente, die mit einem erfindungsgemäßen Protein reagieren.

Die Erfindung betrifft ferner ein Konstrukt, das eine erfindungsgemäße Nucleinsäure und/oder ein Fragment davon unter der Kontrolle von Expressions-Regulationselementen enthält. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bedeutet ein "Konstrukt", das hier auch als Vektor bezeichnet sein kann, die Kombination einer erfindungsgemäßen Nucleinsäure oder eines Fragments davon mit mindestens einem Nucleinsäure-Zusatzelement, beispielsweise einem Regulationselement. Beispiele für solche Regulationselemente sind konstitutive oder induzierbare Promotoren, wie der *E.coli*-Promotor araBAD (Carra und Schlieff, EMBO J., 12 (1993), 35-44) zur Expression in Bakterien, der Hefepromotor PMA1 (Rentsch et al., FEBS Lett., 370 (1995), 264-268) zur Expression in Pilz-Systemen und der virale CaMV35S Promotor (Pietrzak et al., Nucl. Acids Res., 14 (1986), 5857-5868) zur Expression in Pflanzen. Ferner kann die Nucleinsäure oder das Fragment mit einem Transkriptions-Terminationssignal versehen werden. Derartige Elemente sind be-

- 18 -

reits beschrieben worden (vgl. zum Beispiel Gielen et al., EMBO J., 8 (1984), 23-29). Die Transkriptionsstart- und -terminationsbereiche können nativ (homolog) als auch fremdartig (heterolog) zum Wirtsorganismus sein. Die Sequenz der Transkriptionsstart- und -terminationsregionen kann synthetischen oder natürlichen Ursprungs sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen Bestandteilen enthalten. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Konstrukt ein Plasmid.

Die Nucleinsäure oder das Fragment kann in dem Konstrukt, insbesondere einem Plasmid, sowohl in Antisinnorientierung als auch in Sinnorientierung zu dem/den regulatorischen Element(en) vorliegen. Liegt die Nucleinsäure oder das Fragment beispielsweise in Sinnorientierung zu dem regulatorischen Element, beispielsweise einem Promotor, vor, kann sie/es, insbesondere nach Transformation und Integration in höherer Kopiezahl in das Genom, durch Co-suppressionseffekte die Aktivität des endogenen Transporters der inneren Mitochondrienmembran hemmen oder reduzieren. Wenn die Nucleinsäure oder das Fragment in dem Konstrukt in Antisinnorientierung zu dem regulatorischen Element vorliegt, kann das Konstrukt beispielsweise in das Genom einer pflanzlichen Wirtszelle eingeführt werden und nach seiner Transkription zur Unterdrückung der Bildung der pflanzeigenen mitochondrialen Transporter-Moleküle führen.

Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst daher ein Konstrukt, das eine er-

findungsgemäße Nucleinsäure oder ein Fragment davon in Antisinnorientierung zu einem Promotor umfasst, wobei in einer das Konstrukt enthaltenden Wirtszelle die Expression eines mitochondrialen Transportermoleküls oder gegebenenfalls die Expression eines plastidären Transportermoleküls gehemmt wird. Dabei umfasst das Nucleinsäure-Fragment mindestens 10 Nucleotide, vorzugsweise mindestens 50 Nucleotide, besonders bevorzugt mindestens 200 Nucleotide. Das Konstrukt, das eine erfindungsgemäße Nucleinsäure oder ein Fragment davon enthält, kann in eine Wirtszelle eingebracht und dort in eine nicht-translatierbare RNA (Antisinn-RNA) transkribiert werden, die durch Bindung an ein endogenes Gen für einen mitochondrialen Transporter oder an die daraus transkribierte mRNA die Expression dieses endogenen Gens hemmen kann.

Eine andere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Konstrukt, das eine erfindungsgemäße Nucleinsäure oder ein erfindungsgemäßes Nucleinsäure-Fragment in Sinnorientierung zu einem regulatorischen Element, zum Beispiel einem Promoter, enthält, dem sich eine weitere, gleiche oder andere erfindungsgemäße Nucleinsäure oder ein weiteres, gleiches oder anderes erfindungsgemäßes Nucleinsäure-Fragment in Antisinnorientierung dazu anschließt. Diese Anordnung ermöglicht die Ausbildung einer Doppelstrang-RNA, die den Abbau der endogenen RNA induzieren kann (Chuang und Meyerowitz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97 (2000), 4985-90; Sijen und Kooter, Bioessays, 22, (2000), 520-531).

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der Erfindung enthält das Plasmid ein Replikationssignal für *E. coli* und/oder Hefe und ein Marker-Gen, das eine positive Selektion der mit dem Plasmid transformierten Wirtszellen erlaubt. Wird das Plasmid in eine pflanzliche Wirtszelle eingeführt, so können je nach Einführungsverfahren weitere Sequenzen erforderlich sein, die dem Fachmann bekannt sind. Ist das Plasmid beispielsweise ein Derivat des Ti- oder Ri-Plasmids, so muss die einzuführende Nucleinsäure oder das einzuführende Fragment davon von T-DNA-Sequenzen flankiert sein, die die Integration der Nucleinsäure oder des Fragments davon in das pflanzliche Genom ermöglichen. Die Verwendung von T-DNA zur Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht worden und beispielsweise in EP 120 516; Hoekema, The Binary Plant Vector System, Kapitel V (1985), Offset-drukkerij Kanters B.V. Ablasserdam; Fraley et al., Crit. Rev. Plant Sci., 4 (1985), 1-46, und An et al., EMBO J., 4 (1985), 277-287 beschrieben. Ist die eingeführte Nucleinsäure oder das Fragment davon einmal im Genom integriert, so ist sie/es dort in der Regel stabil und wird auch in der Nachkommenschaft der ursprünglich transformierten Zelle erhalten.

Die im Genom integrierte Sequenz kann ebenfalls einen Selektionsmarker enthalten, der beispielsweise den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid oder einem Antibiotikum, wie Kanamycin, G418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin, verleiht. Der verwendete Marker gestattet die Selektion transformierter Zellen ge-

- 21 -

genüber Zellen, in denen die transformierte DNA nicht vorhanden ist.

Die Erfindung stellt daher auch eine Wirtszelle bereit, die eine erfindungsgemäße Nucleinsäure, insbesondere eine Nucleinsäure mit einer in SEQ ID Nr. 1 oder eine Nucleinsäure mit einer in SEQ ID Nr. 3 dargestellten Sequenz, oder ein Fragment davon oder ein eine erfindungsgemäße Nucleinsäure oder ein Fragment davon umfassendes Konstrukt enthält. Bei der erfindungsgemäßen Wirtszelle kann es sich um ein Bakterium oder eine Hefe-, Insekten-, Säuger- oder Pflanzenzelle handeln.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung eine transgene Pflanze, die in mindestens einer ihrer Zellen eine erfindungsgemäße Nucleinsäure, die ein Protein mit MCF-Aktivität codiert, oder ein Fragment davon oder ein erfindungsgemäßes Konstrukt enthält. Bei transgenen Pflanzen kann es sich um Pflanzen der verschiedensten Arten, Gattungen, Familien, Ordnungen und Klassen handeln, das heißt sowohl monocotyle als auch dicotyle Pflanzen, ebenso wie Algen, Moose, Farne oder Gymnospermae. Transgene Pflanzen können auch Kalli, Pflanzenzellkulturen, sowie Teile, Organe, Gewebe, Ernte- oder Vermehrungsmaterialien dieser Pflanzen umfassen. In der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei den transgenen Pflanzen insbesondere um Tabak-, Kartoffel-, Tomaten-, Zuckerrüben-, Sojabohnen-, Kaffee-, Erbsen-, Bohnen-, Baumwoll-, Reis- oder Maispflanzen.

- 22 -

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bedeutet der Ausdruck "in mindestens einer ihrer Zellen", dass eine transgene Pflanze mindestens eine Zelle, vorzugsweise jedoch eine Vielzahl von Zellen enthält, die eine oder mehrere stabil integrierte erfindungsgemäße Nucleinsäure oder ein Fragment davon oder ein erfindungsgemäßes Konstrukt enthalten. Die Nucleinsäure oder ein Fragment davon oder ein erfindungsgemäßes Konstrukt kann sowohl im Zellkern als auch im mitochondrialen oder plastidären Genom integriert sein. Vorzugsweise ist die Nucleinsäure, das Fragment oder das Konstrukt an einer Stelle der Zelle integriert, die nicht ihrer/seiner natürlichen Position entspricht, oder in einer Kopienzahl und/oder Orientierung integriert, die nicht der natürlicherweise vorkommenden Kopienzahl und/oder Orientierung entspricht.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung einer transgenen, vorzugsweise fertilen Pflanze, das die folgenden Schritte umfasst:

- Einbringen einer erfindungsgemäßen Nucleinsäure, insbesondere einer Nucleinsäure mit einer in SEQ ID Nr. 1 dargestellten Sequenz oder einer Nucleinsäure mit einer in SEQ ID Nr. 3 dargestellten Sequenz, oder eines Fragments davon oder eines einer erfindungsgemäßen Nucleinsäure oder ein Fragment davon enthaltenden Konstrukts in eine Pflanzenzelle; und
- Regenerieren einer, vorzugsweise fertilen Pflanze aus der transformierten Pflanzenzelle, wobei min-

destens eine Zelle dieser Pflanze transgen ist, das heißt eine stabil integrierte Nucleinsäure der vorliegenden Erfindung enthält und vorzugsweise exprimiert, das heißt die integrierte Nucleinsäure zu RNA transkribiert. Vorzugsweise weist die erhaltene Pflanze in mindestens einem ihrer Mitochondrien eine modifizierte Aktivität eines Transporters der inneren Mitochondrienmembran auf.

Für das Einbringen einer Nucleinsäure in eine Pflanzenzelle stehen eine Vielzahl von Verfahren zur Verfügung. Bei den meisten der Verfahren ist es erforderlich, dass die einzuführende Nucleinsäure in einem Konstrukt, wie einem Vektor, vorliegt. Vektoren, beispielsweise Plasmide, Cosmide, Viren, Bakteriophagen, Shuttle-Vektoren und ähnliche sind bekannt. Vektoren umfassen oft Funktionseinheiten, die der Stabilisierung des Vektors in einer Wirtszelle dienen und seine Replikation darin ermöglichen. Außerdem können Vektoren Regulationselemente enthalten, mit denen die Nucleinsäure funktionell verbunden ist und die die Expression der Nucleinsäure ermöglichen.

Neben der Transformation mit Hilfe von Agrobakterien, beispielsweise *Agrobacterium tumefaciens*, stehen noch zahlreiche weitere Verfahren zur Verfügung. Diese Verfahren umfassen die Fusion von Protoplasten, die Mikroinjektion von DNA, die Elektroporation sowie biolistische Verfahren und Virusinfektions-Verfahren. Anders als bei der Transformation mit Hilfe von Agrobakterien, werden bei der Injektion und Elektroporation an sich keine spe-

- 24 -

ziellen Anforderungen an den Vektor gestellt. Es können einfache Plasmide wie zum Beispiel pUC-Derivate verwendet werden. Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens vorteilhaft.

Aus den transformierten Pflanzenzellen können dann in einem geeigneten Medium, das gegebenenfalls Antibiotika oder Biozide zur Selektion enthält, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden. Die so erhaltenen Pflanzen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA getestet werden. Die transformierten Zellen wachsen innerhalb der Pflanzen in der üblichen Weise (siehe auch McCormick et al., Plant Cell Reports, 5 (1986), 81-84). Diese Pflanzen können wie üblich angezogen werden und mit Pflanzen, die die gleiche transformierte Erbanlage oder andere Erbanlagen besitzen, gekreuzt werden. Die daraus entstehenden hybriden Individuen weisen die entsprechenden phänotypischen Eigenschaften auf.

Die vorliegende Erfindung umfasst auch ein Verfahren zur Modifikation der Eigenschaften des mitochondrialen und/oder plastidären Transports einer Pflanze, insbesondere zur Modifikation des mitochondrialen Arginin/Ornithin- oder Succinat/Fumarat-Transports in einer Pflanzenzelle, einem Pflanzengewebe, einem Pflanzenorgan und/oder einer ganzen Pflanze, wobei eine erfindungsgemäße Nucleinsäure, insbesondere eine Nucleinsäure mit einer in SEQ ID Nr. 1 dargestellten Sequenz oder eine Nucleinsäure mit einer in SEQ ID Nr. 3 dargestellten Sequenz oder ein Fragment davon in eine Pflanzen-

zelle und/oder eine Pflanze eingebracht und anschließend eine ganze Pflanze regeneriert wird, wobei in mindestens einer ihren Zellen eine Expression der transformierten Nucleinsäure stattfinden kann, so daß eine Pflanze mit verändertem Metabolit-Gehalt erhalten wird.

Zur Modifikation der Eigenschaften des mitochondrialen Transports einer Pflanze kann sowohl die Spezifität des Transportsystems, wobei der Transport neuer Verbindungen ermöglicht wird, als auch der Transportmechanismus verändert werden. Beispielsweise betrifft die Erfindung Modifikationen des mitochondrialen und/oder plastidären Transports in einer Pflanze, im Rahmen derer die Affinität und/oder Substratspezifität eines Transporters der inneren Mitochondrienmembran, insbesondere eines MCF-Transportermoleküls, dahingehend verändert wird, dass es zu einem effizienteren Transport in die oder aus den Mitochondrien kommt. Dies kann geschehen, indem zum Beispiel eine Überexpression des MCF-Transportermoleküls bewirkt wird, zum Beispiel durch Einführen mehrerer Genkopien oder von Konstrukten, die die erfindungsgemäße isolierte Nucleinsäuresequenz unter Kontrolle eines starken konstitutiv oder gewebe- und/oder zeitspezifisch exprimierenden Promoters enthalten. Ebenso können Modifikationen des mitochondrialen Transports durch Repression, Suppression und/oder Cosuppression endogener MCF-Gene erzielt werden, wodurch es zum Beispiel zu gezielten Akkumulationen bestimmter Substanzen inner- oder außerhalb der Mitochondrien beziehungsweise Plastiden kommt. Derartige die endogen vorhandene MCF-Aktivität hemmende Effekte

können erfindungsgemäß durch Transformation von Pflanzenzellen mit Antisinnkonstrukten und/oder Integration mehrerer Sinn-Konstrukte, um einen Co-suppressionseffekt zu erhalten, und/oder mittels eines Knockout-Ansatzes erzielt werden. Selbstverständlich können auch endogen vorhandene Gene der Transporter der inneren Mitochondrienmembran mittels der erfindungsgemäßen Nucleinsäuren in ihrer Aktivität direkt gehemmt werden, beispielsweise durch Integration in die endogen vorhandene Nucleinsäure mittels homologer Rekombination.

Die vorliegende Erfindung betrifft also auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuren zur Modifikation des mitochondrialen und/oder plastidären Transports, insbesondere an der inneren Mitochondrienmembran von Pflanzen oder an der inneren Plastidenmembran von Pflanzen.

Die Erfindung stellt in bevorzugter Ausführungsform Verfahren zur Verwendung der vorgenannten Nucleinsäuren zur Verfügung, gemäß derer insbesondere der Aminosäure- und/oder Carbonsäuretransport an der inneren Mitochondrienmembran modifiziert wird.

Insbesondere betrifft die Erfindung Verfahren zur Modifikation des mitochondrialen Arginin- und Ornithin-Transports. Die Aminosäure Arginin stellt in den Samen und Speicherorganen vieler Pflanzen die Hauptspeicherform für Stickstoff dar. Während der Keimung wird das in Speicherproteine eingebaute oder als freie Aminosäure vorliegende Arginin durch das Enzym Arginase zunächst in Ornithin und Harnstoff gespalten. Der so entstandene Harnstoff wird

dann von Urease zu Ammonium und CO_2 abgebaut. Das freigesetzte Ammonium kann dann in die während der Keimung besonders wichtige Aminosäure-Biosynthese einfließen. Die beiden Enzyme Arginase und Urease sind in pflanzlichen Zellen in der Matrix der Mitochondrien lokalisiert, so dass das im Cytosol vorliegende Arginin zunächst durch die innere Mitochondrienmembran transportiert werden muss.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der Erfindung sieht daher die Überexpression oder ektopische Expression des erfindungsgemäßen pflanzlichen mitochondrialen Arginin/Ornithin-Transporters unter Kontrolle verschiedener Promotoren, zum Beispiel CaMV-35S oder samenspezifische Promotoren, vor, um die Effizienz der Stickstoffmobilisierung durch den Arginin-Abbau zu erhöhen und so das Keimungsverhalten zu verbessern.

Ornithin ist eine Vorstufe für die Synthese von Alkaloiden wie Nikotin, Atropin und Kokain. Durch Veränderung des Ornithin-Pools kann daher eine Veränderung des Alkaloid-Gehalts erreicht werden.

Eine weitere besonders bevorzugte Ausführungsform der Erfindung sieht daher die Überexpression oder ektopische Expression und anti-sense-Inhibition des pflanzlichen Arginin/Ornithin-Transporters zur Veränderung des Alkaloid-Gehalts in Pflanzen vor.

Die Erfindung betrifft ebenfalls Verfahren zur Modifikation des mitochondrialen Succinat-Transports. In Pflanzen stellt der Transport von Succinat in die Mitochondrien einen entscheidenden Schritt bei

- 28 -

der Mobilisierung des in Form von Fettsäuren gespeicherten Kohlenstoffs dar. Das aus der β -Oxidation stammende Acetyl-CoA wird in den Glyoxysomen zu Succinat umgewandelt, welches dann in den Citrat-Zyklus eingeschleust werden kann. Die Effizienz und Geschwindigkeit, mit der die gespeicherte Energie mobilisiert werden kann, ist insbesondere bei der Keimung fettspeichernder Samen von zentraler Bedeutung.

Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sieht daher die Überexpression oder ekto-pische Expression des pflanzlichen mitochondrialen Succinat-Transporters unter der Kontrolle verschiedener Promotoren, zum Beispiel CaMV-35S oder samen-spezifische Promotoren, vor, um die Effizienz der Energiegewinnung aus der β -Oxidation von Fettsäuren zu erhöhen und so das Keimungsverhalten von Samen zu verbessern.

Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuren, insbesondere eine Nucleinsäure mit einer in SEQ ID Nr. 1 dargestellten Sequenz oder eine Nucleinsäure mit einer in SEQ ID Nr. 3 dargestellten Sequenz, können darüber hinaus zur Isolierung homologer Sequenzen aus Bakterien, Pilzen, Pflanzen, Tieren und/oder Menschen verwendet werden. Um nach homologen Sequenzen suchen zu können, müssen zunächst Genbanken angelegt werden, beispielsweise genomische Banken oder oder cDNA-Banken. Mit Hilfe einer Sonde, die Teile der vorstehend beschriebenen Nucleinsäuren enthält, können dann aus den Genbanken verwandte Sequenzen isoliert werden. Nach Identifizierung und/oder Isolierung der entsprechenden Gene können DNA- und

Aminosäuresequenzen bestimmt und die Eigenschaften der von diesen Sequenzen codierten Proteine analysiert werden.

Ferner können die erfindungsgemäßen Nucleinsäuren verwendet werden, um die Expression eines erfindungsgemäßen Transporters der inneren Mitochondrienmembran, insbesondere eines MCF-Mitglieds, in pro- und/oder eukaryontischen Zellen zu untersuchen. Werden die vorstehend beschriebenen Nucleinsäuren beispielsweise in prokaryontischen Zellen, wie Bakterien, eingeführt, so wird eine von Bakterien translatierbare RNA-Sequenz eines eukaryontischen Transporters der inneren Mitochondrienmembran, insbesondere eines eukaryontischen MCF-Mitglieds, gebildet, die trotz der erheblichen Unterschiede in den Membranstrukturen von Pro- und Eukaryonten in ein funktionales eukaryontisches MCF-Mitglied mit dessen Substratspezifität translatiert wird. Diese Bakterienzellen können daher für Untersuchungen der Eigenschaften eines Transportermoleküls sowie seiner Substrate verwendet werden. Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuren können erfindungsgemäß unter der Kontrolle eines regulatorischen Elements in Antisinnorientierung zur Hemmung der Expression eines endogenen Transporters der inneren Mitochondrienmembran, insbesondere eines endogenen MCF-Mitglieds, in pro- und/oder eukaryontischen Zellen verwendet werden. Die Herstellung transgener Nutzpflanzen stellt eine weitere Verwendungsmöglichkeit dieser Nucleinsäuren dar.

Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuren beziehungsweise die von ihnen codierten MCF-Transportermoleküle

können darüber hinaus auch für Untersuchungen von Herbiziden verwendet werden. Einige der für Pflanzen essentiellen Transportermoleküle stellen Targets für Herbizide dar, die die Funktion der Transporter inhibieren können. Erfindungsgemäß können insbesondere in Hefe Screeningverfahren durchgeführt werden, um nach Inhibitoren der erfindungsgemäßen MCF-Transporter zu suchen. Im Hefesystem können diese Inhibitoren weiter getestet und gegebenenfalls durch chemische Modifikation optimiert werden. Anschließend kann ein Test dieser Inhibitoren an Pflanzen durchgeführt werden. Die Verwendung der erfindungsgemäßen MCF-Transporter zur Untersuchung von Herbiziden ist insofern von besonderem Interesse, als die mitochondrial carrier-Familie Eukaryonten-spezifisch ist, so dass ein gegen ein MCF-Mitglied gerichtetes Herbizid für Bodenbakterien unschädlich sein sollte. Aufgrund der vergleichsweise hohen Divergenz zwischen Protein-Sequenzen der MCFs aus verschiedenen Spezies ist es deshalb möglich, Herbizide mit geringer Toxizität gegenüber nicht-pflanzlichen Organismen zu identifizieren.

Da der Wirkungsort vieler Herbizide in den Plastiden beziehungsweise Mitochondrien liegt, ist ihr Eintransport ein guter Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Resistenzmechanismen. Durch eine erfindungsgemäß vorgesehene gezielte Veränderung der Substratspezifität plastidär lokalisierter erfindungsgemäßer MCF-Mitglieder lassen sich Nutzpflanzen erzeugen, in denen Herbizide ihren Wirkungsort nicht erreichen.

Die folgenden Figuren und Beispiele erläutern die Erfindung. Die Figuren zeigen:

- Figur 1 a) eine Hydrophobizitätsanalyse nach Kyte-Doolittle für die Proteine ARG11 und atARG11,
- b) eine schematische Darstellung der Struktur eines MCF-Mitglieds am Beispiel von AtARG11,
- Figur 2 die Komplementation der Hefemutante arg ARG11 durch Expression des AtARG11-Gens unter Kontrolle des PMA-Promoters,
- Figur 3 die Komplementation der Hefemutante acr1 durch Expression des AtACR1-Gens unter Kontrolle des PMA-Promoters.

Das Sequenzprotokoll umfasst:

SEQ ID Nr. 1 zeigt die 891 Nucleotide umfassende DNA-Sequenz des Gens AtARG11 aus *Arabidopsis thaliana*.

SEQ ID Nr. 2 zeigt die davon abgeleitete 296 Aminosäuren umfassende Aminosäuresequenz des erfindungsgemäßen mcf-Proteins.

SEQ ID Nr. 3 zeigt die 930 Nucleotide umfassende cDNA-Sequenz des AtACR1-Gens aus *Arabidopsis thaliana*.

SEQ ID Nr. 4 zeigt die davon abgeleitete 309 Aminosäuren umfassende Aminosäuresequenz eines weiteren erfindungsgemäßen mcf-Proteins.

Die SEQ ID Nr. 5 bis 10 zeigen für die Clonierung verwendete Primer aus *Arabidopsis thaliana*.

Beispiele:

Allgemeine Verfahren:

- a) Clonierungsverfahren: zur Clonierung in *E. coli* und zur Transformation von Hefen wurde der Vektor pDR195 (D. Rentsch et al., FEBS Lett., 370 (1995), 264-268) eingesetzt. Zur Pflanzentransformation wurden die Genkonstrukte in den binären Vektor CHF3, ein Derivat von pPZP212 (P. Hajdukiewicz et al., Plant Mol. Biol., 25 (1994), 989-994) cloniert.

Zur Lokalisierung des Proteins in Pflanzen wurde der Vektor pSMGFP4 verwendet.

- b) Bakterien- und Hefestämme: Für die Amplifikation und Clonierung der verschiedenen Vektoren wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α verwendet.

Als Hefestamm wurden 1c1636d (arg11-1, ura3⁻), ein Derivat von MG409(ura3⁻) (Delforge et al., Eur. J. Biochem., 57 (1975), 231), und G60 (acr1, ura3⁻) ein Derivat von 23344c (ura3⁻) (Grenson et al.) eingesetzt.

- c) Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*: Der DNA-Transfer in die Agrobakterien erfolgte

durch direkte Transformation nach dem Verfahren von Höfigen und Willmitzer (Nucl. Acids Res., 16 (1988), 9877). Die Plasmid-DNA transformierter Agrobakterien wurde nach dem Verfahren von Birnboim und Doly (Nucl. Acids Res., 7 (1979), 1513-1523) isoliert und nach Spaltung mit geeigneten Restriktionsenzymen gelelektrophoretisch analysiert.

- d) Pflanzentransformation: Die Pflanzentransformation kann mittels eines Gentransfers, der durch *Agrobacterium tumefaciens* (Stamm C58C1, pGV2260) vermittelt wird, erfolgen (Deblaere et al., Nuc. Acids Res., 13 (1985), 4777-4788). Die Transformation von *A. thaliana* erfolgt beispielsweise mittels Vakuum-Infiltration (modifiziert nach Bechtold et al. (Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie III, Sciences de la Vie, 316 (1993), 1194-1199). Töpfe (Durchmesser 10 cm) werden mit Erde gefüllt und anschließend mit einem Fliegennetz überspannt. Auf diesem Netz werden *A. thaliana*-Samen ausgesät. Sechs bis acht Wochen nach dem Aussäen wurden die Pflanzen für die Vakuum-Infiltration benutzt. Zur Vakuum-Infiltration wurden von den entsprechenden Agrobacterium-Stämmen 2 x 1 Liter Kulturen in YEB-Medium angezogen, das Antibiotika enthielt (50 µg/ml Kanamycin und 100 µg/ml Rifampicin) bei 28°C angezogen. Bei einer OD₆₀₀ von 1,5 werden die Zellen bei 3000 g geerntet und in 600 ml Infiltrationsmedium (0,5 x MS-Medium (Sigma), 5% Saccharose, 44 µM Benzylaminopurin) resuspendiert. Die Bakteriensuspension wird in 250 ml Weckgläser gefüllt und in einen Exsikkator ge-

- 34 -

stellt. Die *A. thaliana*-Pflanzen werden "kopfüber" in die Baktierensuspension getaucht, dann wird ein fünfminütiges Vakuum angelegt. Nach 3-4 Wochen werden die Samen dieser Pflanze geerntet. Zur Oberflächensterilisation werden die Samen 10 Minuten in 4% Natriumhypochlorid, 0,02% Triton geschüttelt, bei 1500 g abzentrifugiert, viermal mit sterilem Wasser gewaschen und in 3 ml 0,05% Agarose (pro 5000 Samen) resuspendiert. Die Samen-Agarose-Lösung wird auf MSS Medium (1 x MS, 1% Saccharose, 0,8% Agarose, 50 µ/ml Kanamycin, pH 5,8) ausgebreitet (Platten mit 13,5 cm Durchmesser für 5000 Samen). Zur Reduzierung des Feuchtigkeitsverlustes werden die Platten mit Parafilm® verschlossen. Die Kanamycin-resistenten Pflanzen werden in Erde umgesetzt. Samen dieser Pflanzen werden geerntet und analysiert.

Beispiel 1:

Clonierung des Arginin/Ornithin-Transportergens aus *Arabidopsis thaliana*

Das AtARG11-Gen wurde mit Hilfe des PCR-Verfahrens aus einer cDNA-Genbank von *Arabidopsis thaliana* mit den Primern AtARG11-f (5'-agcctcgagatggatttctggccggagtttatg-3', SEQ ID Nr. 5) und AtARG11-r (5'-ttcggatcctcaatctcctgtgacaatatc-3', SEQ ID Nr. 6) amplifiziert. Der Primer AtARG11-f enthält eine XhoI-Spaltstelle und der Primer AtARG11-r eine BamHI-Spaltstelle. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und XhoI gespalten und in das Plasmid pDR 195, das ebenfalls mit den Restrikti-

- 35 -

onsenzymen BamHI und XhoI gespalten worden war, ligiert. Anschließend wurde das Plasmid in *E. coli*-Zellen transformiert.

Die Insertionen in den Plasmiden wurden sequenziert. Eine cDNA-Sequenz mit 891 Nucleotiden konnte ermittelt werden (SEQ ID Nr. 1). SEQ ID Nr. 2 zeigt die dazugehörige Aminosäuresequenz des erfindungsgemäßen Arginin-Ornithin-Transportermoleküls.

Etwa 1 µg des Plasmids wurden nach dem Verfahren von Gietz (Gietz et al., Yeast 11 (1995), 355-360) in den Hefestamm 1c1636d transformiert. Anschließend wurden Hefe-Transformanten selektiert, die auf Minimalmedium ohne Arginin wachsen konnten.

Beispiel 2:Clonierung des Succinat-Transportergens aus *Arabidopsis thaliana*

Das AtACR1-Gen wurde mit Hilfe des PCR-Verfahrens aus einer cDNA-Genbank von *Arabidopsis thaliana* mit dem Primer AtACR1-f (5'-acgctcgagatggcgacgag-aacggaatc-3', SEQ ID Nr. 7), der eine Spaltstelle für das Restriktionsenzym XhoI enthält, und dem Primer AtACR1-r (5'-acggcggccgcctataaaggagcattccgaag-3', SEQ ID Nr. 8), der eine NotI-Spaltstelle enthält, isoliert.

Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen XhoI und NotI gespalten und in das Plasmid pDR 195, das ebenfalls mit den Restriktionsenzymen XhoI und NotI gespalten worden war, ligiert. Anschließend wurden *E. coli*-Zellen mit dem Plasmid transformiert.

Das Insert des Plasmides wurde sequenziert. Es konnte eine 930 Nucleotide umfassende cDNA-Sequenz ermittelt werden (SEQ ID Nr. 3). Die Aminosäuresequenz des von dieser DNA-Sequenz codierten Succinat-Transporters ist in SEQ ID Nr. 4 gezeigt und umfasst 309 Aminosäuren.

Etwa 1 µg des Plasmids nach dem Verfahren von Gietz (Gietz et al., Yeast 11 (1995), 355-360) wurden in den Hefestamm G60 transformiert. Anschließend wurden Hefe-Transformanten selektiert, die auf Minimalmedium mit Ethanol als einziger Kohlenstoffquelle wachsen konnten.

Beispiel 3:Clonierung der AtARG11- und AtACR1-Gene in den Vektor CHF3

Das AtACR1-Gen und das AtARG11-Gen wurden in den Vektor CHF3 cloniert, um in Pflanzen eine Überexpression zu erreichen. Die Gene wurden aus den entsprechenden pDR195-Konstrukten mit BamHI und XhoI herausgeschnitten und in den mit BamHI und SmaI gespaltenen Vektor CHF3 ligiert (CHF3-ARG11). Die erzeugten Plasmide wurden in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert und die resultierenden Bakterienstämme wurden zur Transformation von *Arabidopsis* verwendet.

Zur Lokalisierung in Pflanzen wurde das AtARG11-Gen mittels PCR aus einer cDNA-Genbank von *Arabidopsis thaliana* mit den Primern AtARG11-GFP-f (5'-ttcggatccatggatttctggccggagtttatg-3', SEQ ID Nr. 9) und AtARG11-GFP-r (5'-aatcccgggatctcctgtgacaatatctggg-3', SEQ ID Nr. 10) amplifiziert. Der Primer AtARG11-GFP-f enthält eine BamHI-Spaltstelle und der Primer AtARG11-GFP-r eine SmaI-Schnittstelle. Das mit BamHI und SmaI gespaltene PCR-Produkt wurde in den bVektor pSMGFP4 ligiert, der ebenfalls mit BamHI und SmaI gespalten worden war. Das Genprodukt wurde mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie subzellulär lokalisiert.

Ansprüche

1. Nucleinsäure, die einen pflanzlichen oder tierischen Transporter der inneren Mitochondrienmembran codiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- a) einer Nucleinsäure, die erhältlich ist durch Komplementierung MCF-defizienter Wirtszellen mit Nucleinsäuresequenzen einer pflanzlichen oder tierischen Genbank und durch Selektion MCF-positiver Wirtszellen, oder einem Fragment davon;
- b) einer Nucleinsäure mit einer in SEQ ID Nr. 1 dargestellten Nucleotidsequenz oder einer Nucleinsäure mit einer in SEQ ID Nr. 3 dargestellten Nucleotidsequenz oder einem Fragment davon;
- c) einer Nucleinsäure mit einer Sequenz, die ein Protein mit einer in SEQ ID Nr. 2 dargestellten Sequenz oder ein Protein mit einer in SEQ ID Nr. 4 dargestellten Sequenz codiert, oder einem Fragment davon;
- d) einer Nucleinsäure, die zu einer Nucleinsäure nach a) bis c) komplementär ist, oder einem Fragment davon;

-39-

e) einer Nucleinsäure, die durch Substitution, Addition, Inversion und/oder Deletion einer oder mehrerer Basen einer Nucleinsäure nach a) bis d) erhältlich ist; und

f) einer Nucleinsäure, die aufgrund der Degeneration des genetischen Codes mit einer Nucleinsäure nach a) bis e) oder einem Fragment davon hybridisiert.

2. Nucleinsäure nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie eine DNA oder RNA ist.

3. Fragment einer Nucleinsäure nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass es in einer Wirtszelle in Antisinnorientierung zu einem Promoter die Expression eines pflanzlichen MCF-Mitglieds hemmen kann.

4. Fragment nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass es mindestens 10 Nucleotide, vorzugsweise mindestens 50 Nucleotide, besonders bevorzugt mindestens 200 Nucleotide umfasst.

5. Konstrukt, enthaltend eine Nucleinsäure nach Anspruch 1 oder 2 oder ein Nucleinsäure-Fragment nach Anspruch 3 oder 4 unter der Kontrolle von Expressions-Regulationselementen.

6. Konstrukt nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass sich die Nucleinsäure oder das Fragment in Antisinnorientierung zu dem Regulationselement befindet.

7. Konstrukt nach Anspruch 5 oder 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass es in Form eines Plasmids vorliegt.

8. Wirtszelle, enthaltend eine Nucleinsäure nach Anspruch 1 oder 2 oder ein Fragment davon oder ein Konstrukt nach einem der Ansprüche 5 bis 7.

9. Wirtszelle nach Anspruch 8, ausgewählt aus Bakterien, Hefezellen, Säugerzellen und Pflanzenzellen.

10. Transgene Pflanze, enthaltend eine Nucleinsäure nach Anspruch 1 oder 2 oder ein Fragment davon oder ein Konstrukt nach einem der Ansprüche 5 bis 7.

11. Transgene Pflanze, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Nucleinsäure oder das Fragment oder das Konstrukt an einer Stelle des Genoms integriert ist, die nicht seiner natürlichen Position entspricht.

12. Protein, erhältlich durch Expression einer Nucleinsäure nach Anspruch 1 oder 2 in einer Wirtszelle nach Anspruch 8 oder 9.

13. Antikörper, der mit einem Protein nach Anspruch 12 reagiert.

14. Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanze, umfassend die folgenden Schritte:

- Einbringen einer Nucleinsäure nach Anspruch 1 oder 2 oder eines Fragments davon in eine Pflanzenzelle; und

-41-

- Regenerieren einer Pflanze aus der transformierten Pflanzenzelle.

15. Verfahren zur Veränderung des Metabolitgehalts von Pflanzen durch Modifikation der Transportereigenschaften der vorzugsweise inneren Mitochondrienmembran einer Pflanze, eines Pflanzenteils oder einer Pflanzenzelle, umfassend das Einbringen einer Nucleinsäure nach Anspruch 1 oder 2 oder eines Fragments davon oder eines die Nucleinsäure oder das Fragment davon enthaltenden Konstrukts nach einem der Ansprüche 5 bis 7 in eine Pflanzenzelle und gegebenenfalls das Regenerieren einer ganzen Pflanze daraus.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei der Transporter ein Aminosäure- oder Carbonsäuretransporter ist.

17. Verfahren zur Isolierung von mindestens einem Gen, codierend einen pflanzlichen oder tierischen Transporter der inneren Mitochondrienmembran, aus einer Genbank, wobei eine MCF-defiziente Hefezelle mit Nucleinsäuresequenzen aus einer pflanzlichen oder tierischen Genbank transformiert und eine positive Selektion durchgeführt wird.

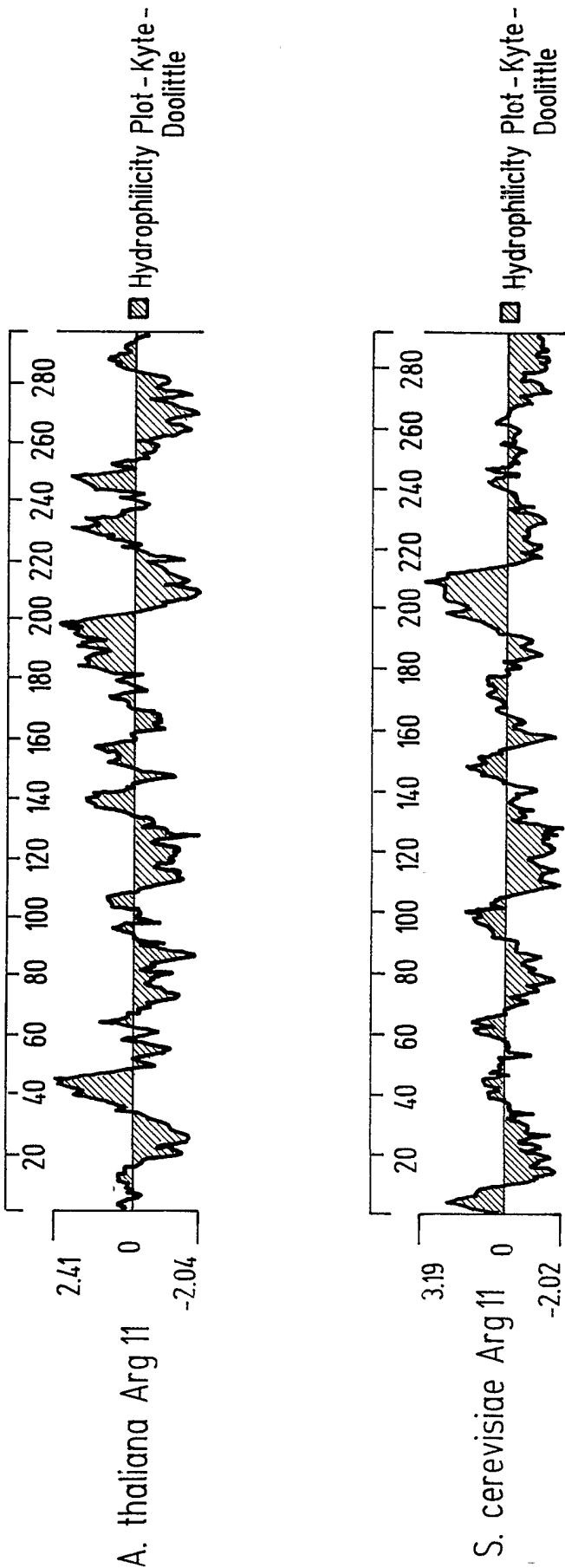
18. Verwendung einer Nucleinsäure nach Anspruch 1 oder 2 oder eines Fragments davon zur Isolierung homologer Sequenzen aus Bakterien, Pilzen, Pflanzen, Tieren und/oder Menschen.

19. Verwendung einer unter der Kontrolle eines Regulationselements in Antisinnorientierung befindlichen Nucleinsäure nach Anspruch 1 oder 2 oder

eines unter der Kontrolle eines Regulationselements in Antisinnorientierung befindlichen Fragmentes davon zur Hemmung der Expression eines endogenen MCF-Mitglieds in pro- und/oder eukaryontischen Zellen.

20. Verwendung einer Nucleinsäure nach Anspruch 1 oder 2 oder eines Fragments davon zur Herstellung transgener Nutzpflanzen mit veränderten mitochondrialen und/oder plastidären Transporteigenschaften.

21. Verwendung einer Nucleinsäure nach Anspruch 1 oder 2 zur Identifizierung von Inhibitoren des durch Transporter der inneren Mitochondrienmembran vermittelten Stofftransports in Mitochondrien und/oder Plastiden.



Hydrophobizitätsanalyse nach Kyte - Doolittle für die Proteine ARG11 und AtARG11.

FIG. 1A

Schematische Darstellung der Struktur eines MCF - Mitglieds

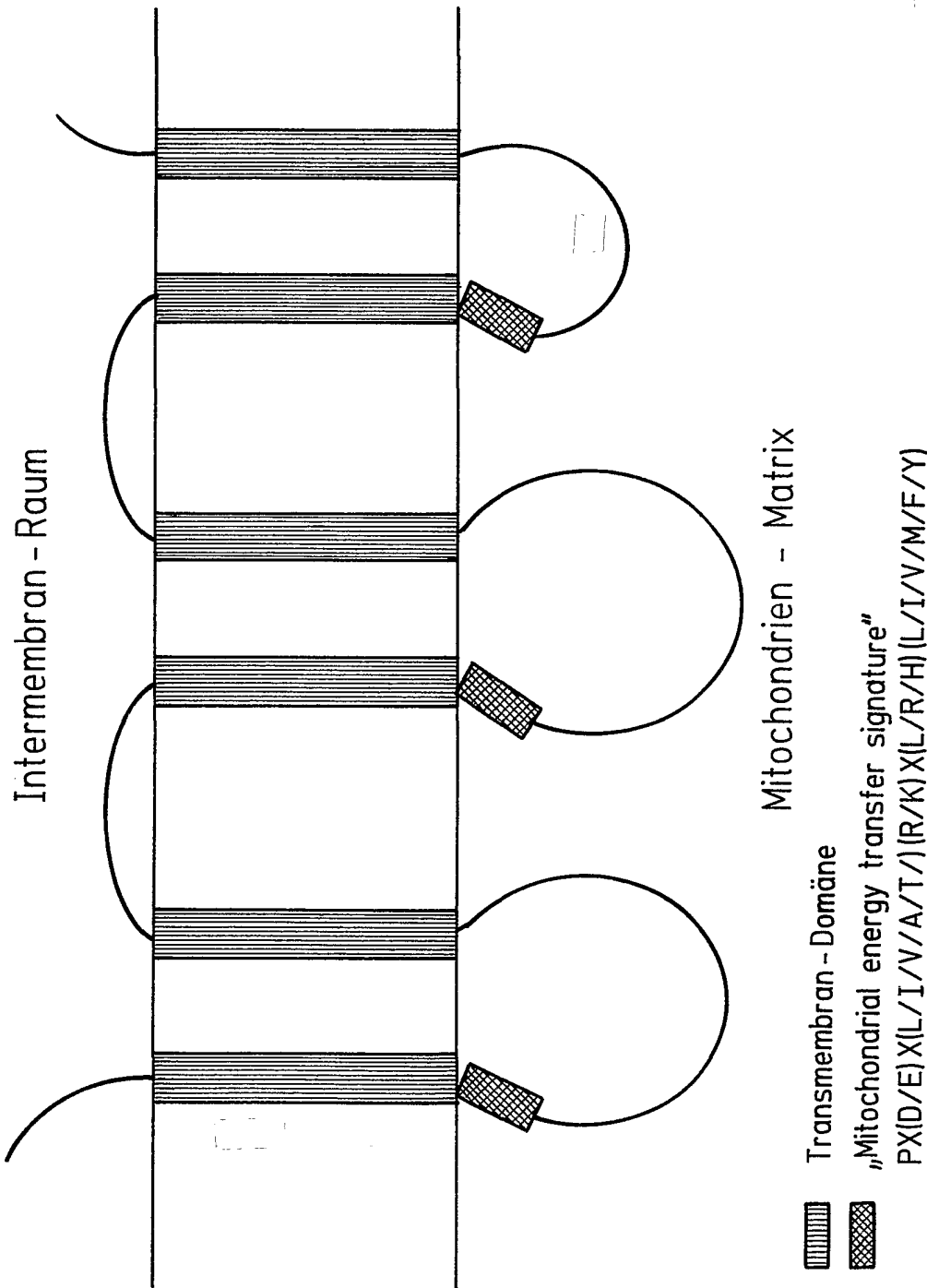


FIG. 1b

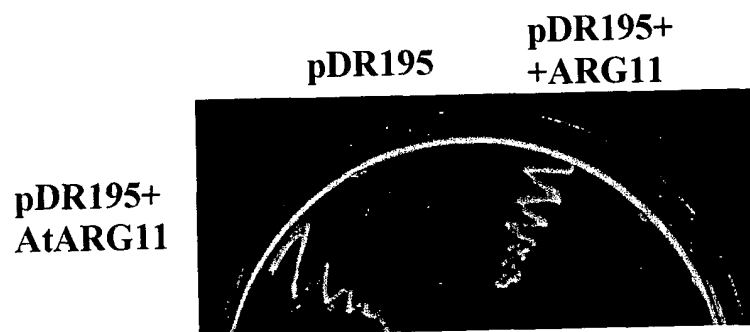


Fig. 2 Komplementation der Hefemutante *arg11* durch Expression des *AtARG11*-Gens unter Kontrolle des PMA-Promoters in pDR195.

FIG. 2

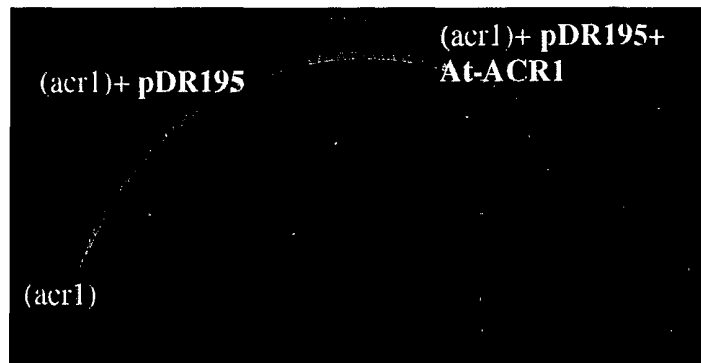


Fig. 3 Komplementation der Hefemutante *acr1* durch Expression des AtACR1-Gens unter Kontrolle des PMA-Promoters.

Fig. 3

SEQUENCE LISTING

<110> Prof. Frommer, Wolf-Bernd

<120> Nucleinsäuren, mit deren Hilfe Pflanzen mit verändertem Metabolit-Gehalt erzeugt werden können.

<130> 16281

<140> unknown

<141> 2000-07-24

<150> UNKNOWN

<151> 2000-07-24

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 891

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

```

atggatttct ggccggagtt tatggcgacc agctggggaa gagagttcgt cgccggtggt 60
ttcgggtggcg tcgccggcat catctocggc tacccttgg acaccctcag aattcgccag 120
caacagagct cgaaatctgg atctgccttc tccattctcc ggcggatgct cgccattgag 180
ggtccctcct ctctctacag aggcattggt gcgccttgg cctccgtcac ttttcagaat 240
gctatggtat tccagatata cgccatattc tctcgctctt ttgattcctc tgttcctctg 300
gtagagcctc ctctctacag aggcgttggc cttgggtggtg ttgccaccgg tgcgtgacag 360
agcctcttgc tcaccctgt cgagctcctc aagattcgtc tccagcttca gcagactaag 420
tctggtccca tcaccttggc caagagcctc cttaggagac agggccttca ggggctttac 480
agaggcctca ccatcaccgt gctccgagat gctcccgtc atggcctcta cttctggacc 540
tatgagtacg tcagagaaag gcttcacccc ggctgcagaa agaccggaca agaaaacctc 600
aggaccatgc tcgtggctgg tggccttggc ggagtggcca gctgggtcgc ttgttatcct 660
cttgatgtcg tcaagaccag actccaacaa ggtcatgggg cttacgaggg cattgccgat 720
tgttttcgca agagcgtcaa acaggaaggc tatacggttc tctggcgtgg cctcgggact 780
gcagttgccg gggcctttgt ggtcaacggg gctatctttg ctgcttatga ggtagccttg 840
cgggtgtctat tcaatcaatc gccatcccca gatattgtca caggagattg a 891

```

<210> 2

<211> 296

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

```

Met Asp Phe Trp Pro Glu Phe Met Ala Thr Ser Trp Gly Arg Glu Phe
 1             5             10             15

Val Ala Gly Gly Phe Gly Gly Val Ala Gly Ile Ile Ser Gly Tyr Pro
          20             25             30

Leu Asp Thr Leu Arg Ile Arg Gln Gln Gln Ser Ser Lys Ser Gly Ser
 35             40             45

Ala Phe Ser Ile Leu Arg Arg Met Leu Ala Ile Glu Gly Pro Ser Ser
 50             55             60

Leu Tyr Arg Gly Met Ala Ala Pro Leu Ala Ser Val Thr Phe Gln Asn
 65             70             75             80

```

-2-

Ala Met Val Phe Gln Ile Tyr Ala Ile Phe Ser Arg Ser Phe Asp Ser
 85 90 95

Ser Val Pro Leu Val Glu Pro Pro Ser Tyr Arg Gly Val Ala Leu Gly
 100 105 110

Gly Val Ala Thr Gly Ala Val Gln Ser Leu Leu Leu Thr Pro Val Glu
 115 120 125

Leu Ile Lys Ile Arg Leu Gln Leu Gln Gln Thr Lys Ser Gly Pro Ile
 130 135 140

Thr Leu Ala Lys Ser Ile Leu Arg Arg Gln Gly Leu Gln Gly Leu Tyr
 145 150 155 160

Arg Gly Leu Thr Ile Thr Val Leu Arg Asp Ala Pro Ala His Gly Leu
 165 170 175

Tyr Phe Trp Thr Tyr Glu Tyr Val Arg Glu Arg Leu His Pro Gly Cys
 180 185 190

Arg Lys Thr Gly Gln Glu Asn Leu Arg Thr Met Leu Val Ala Gly Gly
 195 200 205

Leu Ala Gly Val Ala Ser Trp Val Ala Cys Tyr Pro Leu Asp Val Val
 210 215 220

Lys Thr Arg Leu Gln Gln Gly His Gly Ala Tyr Glu Gly Ile Ala Asp
 225 230 235 240

Cys Phe Arg Lys Ser Val Lys Gln Glu Gly Tyr Thr Val Leu Trp Arg
 245 250 255

Gly Leu Gly Thr Ala Val Ala Arg Ala Phe Val Val Asn Gly Ala Ile
 260 265 270

Phe Ala Ala Tyr Glu Val Ala Leu Arg Cys Leu Phe Asn Gln Ser Pro
 275 280 285

Ser Pro Asp Ile Val Thr Gly Asp
 290 295

<210> 3

<211> 930

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 3

atggcgacga gaacggaatc gaagaagcag attccgccgt acatgaaagc agtctcaggc 60
 tcactaggcg gagtggtcga ggcttggtgt ctccaaccaa tcgacgtaat caaaacgcgt 120
 ctccagctag atcgcgtcgg cgcttacaaa ggaatcgctc actgtgggtc gaaggtggtt 180
 cgcaccgaag gagttcgtgc tctctggaaa ggcttaacac cgttcgctac tcatctcacg 240
 cttaagtaca cgcttcggat gggatccaac gccatgtttc aaaccgcctt taaggattcc 300
 gagaccggaa aggtcagcaa tcgtggccgt tttctttccg gattcgggtgc cgggtgttctt 360
 gaagctctcg ccattgttac accctttgag gtggtgaaaa ttagacttca gcagcagaaa 420
 ggattgagtc ctgagctttt caagtacaaa ggaccaatac atttggtctag aaccatcgtg 480
 agagaagaaa gcatacttgg tttatggtca ggtgcagcac cgacggttat gcgaaacgga 540
 accaaccaag ctgtaatgtt cacagcgaag aacgcgtttg acatactctt gtggaacaaa 600
 cacgaagggtg acggtaaaat cttgcagcca tggcagtcaa tgatctcagg gtttttagct 660
 ggaaccgcag gtccgttctg cacaggaccg tttgatgtgg tgaaaacgag gttgatggct 720
 cagagcagag acagtgaagg tgggattaga tataaaggga tggttcatgc cattagaacg 780

-3-

atttatgcag aggaaggatt agtggcctta tggagagggt tattgccgag gctaattgagg 840
 attcctccag gacaagccat tatgtgggct gttgctgac aagtcactgg tctttatgag 900
 atgagatatc ttcggaatgc tcctttatag 930

<210> 4

<211> 309

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 4

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

-4-

275

280

285

Trp Ala Val Ala Asp Gln Val Thr Gly Leu Tyr Glu Met Arg Tyr Leu
 290 295 300

Arg Asn Ala Pro Leu
 305

<210> 5
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 5
 agcctcgaga tggatttctg gccggagttt atg 33

<210> 6
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 6
 ttcgatcct caatctctg tgacaatctc 30

<210> 7
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 7
 acgctcgaga tggcgacgag aacggaatc 29

<210> 8
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 8
 acggcgccg cctataaagg agcattccga ag 32

<210> 9
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 9
 ttcgatcca tggatttctg gccggagttt atg 33

<210> 10
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 10
 aatcccgga tctcctgtga caatatctgg g 31