

(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
4. Oktober 2001 (04.10.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/73086 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12N 15/82**,
15/62, 15/11, C07K 14/415, 16/16, C12Q 1/68, A01H 5/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/02148

(22) Internationales Anmeldedatum:
26. Februar 2001 (26.02.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 14 672.4 24. März 2000 (24.03.2000) DE
100 50 233.4 11. Oktober 2000 (11.10.2000) DE

55108 (US). **WEISE, Andreas** [DE/DE]; Hornkopfs-
trasse 23, 72070 Tübingen (DE). **BARKER, Laurence**
[GB/DE]; Schwärzlocher Strasse 32, 72070 Tübingen
(DE). **SCHULZE, Waltraud** [DE/DE]; Jesinger Haupt-
strasse 26, 72070 Tübingen (DE). **KÜHN, Christina**
[DE/DE]; Clinicumgasse 6, 72070 Tübingen (DE).

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

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AL, AU, BR, CA, IL, JP,
KR, LT, LV, MK, RO, SI, US, ZA.

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

Veröffentlicht:

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

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

(71) Anmelder und

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

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **WARD, John, M.**
[US/US]; 1571 Burton Street, Falcon Heights, MN

(54) Title: METHOD FOR GENETICALLY MODIFYING A PLANT

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR GENETISCHEN MODIFIZIERUNG EINER PFLANZE

(57) Abstract: the present invention relates to nucleic acid molecules which code for a saccharide-, especially saccharose, trans-
porter. The invention also relates to vectors and host cells which contain said nucleic acid molecules and plants and plant cells that
are transformed by means of said nucleic acid molecules and vectors. The invention further relates to methods for modifying the
saccharide-, especially saccharose-, transport in plants.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Nucleinsäuremoleküle, die einen Saccharid-, insbesondere Saccha-
rose-Transporter codieren, Vektoren und Wirtzellen, die diese Nucleinsäuremoleküle enthalten sowie mit den beschriebenen Nucle-
insäuremolekülen und Vektoren transformierte Pflanzenzellen und Pflanzen. Weiterhin betrifft die Erfindung Verfahren zur Modifi-
zierung des Saccharid-, insbesondere Saccharose-Transports, in Pflanzen.



WO 01/73086 A2

Verfahren zur genetischen Modifizierung einer Pflanze

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Nucleinsäuremoleküle, die einen Saccharid-, insbesondere Saccharose-Transporter codieren, Vektoren und Wirtszellen, die diese Nucleinsäuremoleküle enthalten sowie mit den beschriebenen Nucleinsäuremolekülen und Vektoren transformierte Pilze, Pflanzenzellen und Pflanzen. Weiterhin betrifft die Erfindung Verfahren zur Modifizierung des Saccharid-, insbesondere Saccharose-Transports, in Pflanzen.

Höhere Pflanzen weisen heterotrophe Gewebe auf, die von autotrophen Geweben mit Kohlenhydraten versorgt werden. Die Haupttransportform der Kohlenhydrate stellt die Saccharose und ihre Derivate dar. Die Versorgung der heterotrophen Gewebe erfolgt über das Phloem, das die Organe, welche Photoassimilate, also Kohlenhydrate, im Überschuss zur Verfügung stellen und die diese exportieren können, also sogenannte Source-Organe mit Organen, die in ihrer Nettobilanz Photoassimilate importieren müssen, also sogenannte Sink-Organe, verbindet. Source-Organe sind beispielsweise ausgewachsene Blätter und keimende Samen. Sink-Organe stellen beispielsweise junge Blätter, junge Knollen, Wurzeln, Früchte, Blüten und sonstige reproduktive Organe dar. Das Phloem ist aus verschiedenen Zelltypen wie Siebelementen, Geleitzellen, Parenchymzellen und Bündel-

-2-

scheidenzellen aufgebaut. In den Siebelementen bewegt sich der Translokationsstrom der Photoassimilate von Orten des Exports zu Orten des Imports. Sowohl die Beladung des Phloems mit Photoassimilaten als auch die Entladung kann dabei grundsätzlich auf apoplastischem und symplastischem Wege erfolgen, wobei eine Vielzahl von Faktoren wie osmotische Verhältnisse, Konzentrationsgefälle, zu passierende Plasmamembranen etc. Einfluss auf die Beladung und Entladung nehmen. Sowohl die Beladung des Phloems als auch die Versorgung der Sink-Organe mit Photoassimilaten sind demgemäss hochkomplexe Vorgänge, die offensichtlich eine Vielzahl von eng miteinander verknüpften und regulierten Transportschritten umfassen. Diese Transportschritte verlaufen unter Beteiligung unterschiedlicher Plasmamembranproteine, insbesondere von Transportproteinen. So sind z. B. aus Pflanzen unterschiedlicher Familien jeweils mehrere Mitglieder aus der Familie der Saccharose-Transporter bekannt, z. B. SUT1 (sucrose transporter). Die SUT-Gene codieren hydrophobe Proteine, die 12 Transmembrandomänen aufweisen und deutlich von den Mitgliedern der Hexose-Transporterfamilie unterschieden werden können. Lalonde et al. (The Plant Cell (1999) 11, 707-726) lässt vermuten, dass die Mitglieder der SUT-Familie hohe Affinität für Saccharose aufweist. Es wird dabei angenommen, dass insbesondere der Saccharose-Transporter SUT1 aus *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana tabacum* und *Solanum tuberosum* für den Langstreckentransport im Phloem zuständig ist (Riesmeier et al., Plant Cell (1993) 5, 1591-1598). Die WO94/00574 offenbart die DNA- und Aminosäuresequenzen von SUT1 aus Spinat und Kartoffel. Dieser in

der Plasmamembran der Siebelemente des Phloems lokalisierte Saccharose-Transporter stellt eine essentielle Komponente für den Langstreckentransport von Saccharose im Phloem dar, wie sich beispielsweise in Antisense-Inhibitionsexperimenten in transgenen Kartoffel- und Tabakpflanzen zeigt (Riesmeier et al., EMBO J (1994) 13, 1-7) (Lalonde et al., a. a. O.). Das Expressionsmuster von SUT1, insbesondere die Expression im gesamten Phloem belegt, dass SUT1 an der Aufrechterhaltung des Konzentrationsgradienten von Saccharose zwischen Be- und Entladungszonen (Blättern, respektive Sink-Organen) verantwortlich ist. SUT1 scheint daher weniger für die (erstmalige) Beladung des Phloems in Source-Organen als vielmehr für die Rückführung aus dem Phloem abgewandelter Saccharose verantwortlich zu sein. Diese Funktion wird weiterhin durch die relativ hohe Affinität und die damit verbundene niedrige Transportkapazität bestätigt. SUT1 kann also sehr geringe Mengen Saccharose aus dem Apoplasten in das Phloem (zurück) importieren und hält somit die apoplastischen Konzentrationen niedrig. Da er bei diesen geringen Konzentrationen arbeitet, kann er nicht für hohe Transportraten verantwortlich sein. Die Kinetiken der Saccharose-Aufnahme in Blattscheiben zeigen deutlich diese beschriebene hochaffine (K_m 2.7 mM) Aufnahme mit niedriger Kapazität (V_{max} 0.7 nmol cm^{-2} min^{-1}) (Delrot & Bonnemain, Plant Physiol. (1981) 67, 560-564). Dieses System wird auch als HAS (high affinity/low capacity system) bezeichnet. Die Einbindung von SUT1 in das gesamte Transport- und Regulationssystem des Saccharose-Transports ist jedoch völlig unklar (Ward et al., Int. Rev. Cytology

- 4 -

(1998) 178, 41-71, Kühn et al., J. Exp. Bot. (1999) 50, 935-953). Dies gilt ebenfalls für die Identifizierung eines (Erst-) Beladungscarriers, der für eine eventuell vorhandene zweite kinetische Komponente HCS (high capacity/low affinity system) verantwortlich ist. Hinzu kommen aller Wahrscheinlichkeit nach vorliegende große Unterschiede in den Saccharose-Transportmechanismen zwischen den unterschiedlichen Pflanzenspezies (Lalonde et al., a. o. O.) und die Vielzahl potenzieller Regulationsmechanismen sowie Einflussfaktoren auf transcriptioneller und post-transcriptioneller Ebene (Kühn et al., Science (1997) 275, 1298-1300). In Lalonde et al. (a. o. O.) wird gemutmaßt, dass neben den Saccharose-Transportern weitere funktionelle Elemente am Saccharose-Transport beteiligt sind, beispielsweise Regulator- und Sensorelemente. Die außerordentliche Komplexität des Saccharose-Transportsystems erlaubt bisher jedoch keine gezielte Zuordnung von Strukturen zu Funktionen und eine Vorhersage von deren Wechselwirkungen in einer Art und Weise, die es ermöglicht, gezielte Eingriffe in den Saccharid-, insbesondere Saccharose-Transport mit dem Ziel vorzunehmen, hinsichtlich bestimmter Eigenschaften verbesserte Pflanzen zu erhalten. Dies lässt sich am deutlichsten daran erkennen, dass eine Überexpression von SUT1 keine Änderungen in der Allokation von Assimilaten erbrachte, sondern lediglich einen Einfluss auf das Blühverhalten zeigte (US 6,025,544; P 44 39 748.8).

Das der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende technische Problem besteht also darin, Verfahren und Mittel für die Herstellung einer gentechnisch

modifizierten Pflanze bereitzustellen, die es erlauben, gezielt in die Saccharid-, insbesondere Saccharose-Transportströme der Pflanze dergestalt einzugreifen, dass eine Pflanze mit verbesserten Eigenschaften, z. B. höheren Zuckergehalten in Sink-Organen, insbesondere in den Ernteorganen, erzeugt werden kann.

Die Erfindung löst dieses Problem durch die Bereitstellung eines Verfahrens zur Modifizierung des Saccharid-Fluxes und/oder der Saccharid-Konzentration, insbesondere Saccharose-Flux und/oder -konzentration in Geweben einer Pflanze, gemäß dem in einer Pflanze eine modifizierte Aktivität eines Saccharid-Transporters mit geringer Saccharid-Affinität, aber hoher Saccharid-Transportkapazität erzeugt wird. Die erfindungsgemäße Lehre stellt erstmals Mittel und Verfahren zur Verfügung, ganz gezielt den Saccharid-Flux und die Saccharid-Konzentration in den verschiedenen Geweben der Pflanze durch Modifizierung der Aktivität eines Saccharid-Transporters mit niedriger Saccharid-Affinität und hoher Saccharid-Transportkapazität zu beeinflussen, d. h. zu modifizieren, wobei im Verlauf dieses Verfahrens eine modifizierte Pflanze hergestellt wird. Die vorliegende Erfindung stellt erstmals ein HCS-System, also ein Saccharose-Transportsystem mit hoher Transportkapazität für Saccharose, aber niedriger Affinität zu Saccharose, bereit das, insbesondere in Mikrovenen einer Pflanze, exprimiert wird.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer Modifizierung der Aktivität des Saccha-

ridtransports, insbesondere eines Saccharidtransporters eine gegenüber der Wildtyp-Aktivität erfolgte Veränderung der normalerweise vorliegenden Aktivität verstanden, z. B. eine vollständige Unterdrückung, Reduzierung oder Aktivitätssteigerung. Diese Aktivitätssteigerung kann auf eine veränderte Aktivität des Proteins selbst zurückzuführen sein, bewirkt z. B. durch posttranscriptionelle Modifikationen wie Phosphorylierungen oder Dephosphorylierungen. Sie kann aber auch auf eine geänderte Expressionsrate des codierenden Gens, eine geänderte Stabilität oder Translationsrate der gebildeten mRNA oder ähnliches, also auch auf eine geänderte Menge vorhandenen Saccharid-Transporters in einem Gewebe zurückgehen. Die Modifizierung der Aktivität des Saccharid-Transporters kann auch durch die Modifizierung der Aktivität eines die Aktivität des Saccharid-Transporters kontrollierenden oder regulierenden Elements, z.B. eines Sensor- oder Regulatorproteins erfolgen.

Unter einem Saccharid wird in bevorzugter Ausführungsform Saccharose und unter einem Saccharid-Transporter ein Saccharose-Transporter, insbesondere, falls nicht anders angegeben, SUT4 (Sucrose transporter 4) verstanden, also ein Transporter mit geringer Affinität zu Saccharose und hoher Transportkapazität für Saccharose.

Geringe oder niedrige Affinität im Sinn der vorliegenden Erfindung ist eine Affinität, die unterhalb der SUT1-Affinität liegt, z.B. um 50%, vorzugsweise 80 %, 100 %, 200 %, 300 % oder 400 % unterhalb der von SUT1 liegt, z.B. eine Affinität $K_m > 2,7 \text{ mM}$,

-7-

vorzugsweise $> 4 \text{ mM}$, $> 6 \text{ mM}$, $> 8 \text{ mM}$, $> 10 \text{ mM}$, $> 15 \text{ mM}$, $> 20 \text{ mM}$ und bevorzugt > 25 , insbesondere 26 mM . Hohe Transportkapazität im Sinn der vorliegenden Erfindung ist eine oberhalb der Transportkapazität von SUT1 liegende Transportkapazität, z.B. um 50% , 100% , 150% , 200% , 300% , 400% oder 500% oberhalb der von SUT1. Bevorzugt ist eine Transportkapazität $V_{\max}$ von $> 0,7$, insbesondere > 1 , $> 1,5$, > 2 , > 3 , $> 3,5$ insbesondere $3,6 \text{ nmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$.

Der Erfindung liegt die Erkenntnis und die daraus abgeleitete Lehre zugrunde, mit technischen, insbesondere gentechnischen, Mitteln, eine gegebenenfalls nur endogen vorhandene Aktivität des genannten Saccharid-Transporters zu beeinflussen oder eine solche Aktivität in eine Pflanze neu einzuführen.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter dem Begriff Sink-Organ Organe oder Gewebe von Pflanzen verstanden, die in ihrer Nettobilanz Photoassimilate importieren müssen. Derartige Pflanzenorgane oder Gewebe sind junge Blätter, Knollen, Früchte, Wurzeln, Blüten, reproduktive Organe, Holz, Markgewebe, Knospen, Samen, Rüben etc.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter dem Begriff Source-Organ Organe oder Gewebe von Pflanzen verstanden, die in ihrer Nettobilanz Photoassimilate im Überschuss aufweisen und diese exportieren können. Source-Organ sind z. B. ausgewachsene Blätter und keimende Samen, Knollen und Zwiebeln.

Erfindungsgemäß konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expressionsrate des erfindungsgemäß modifizierten Saccharid-Transporters beziehungsweise eine erhöhte Transportrate beispielsweise in Geleitzellen und/oder Siebelementen die Saccharid-, insbesondere Saccharose-Beladung des Phloems, insbesondere unter hoher Lichtintensität oder CO₂ Konzentration, beträchtlich erhöht, wodurch vorteilhafterweise Pflanzen mit Ernteorganen erhalten werden können, die einen erhöhten Saccharose-Gehalt aufweisen. Die Erfindung löst das Problem also insbesondere durch die Bereitstellung eines Verfahrens zur Modifizierung des Saccharid-Fluxes und/oder der Saccharid-Konzentration in Geweben einer Pflanze, wobei die Aktivität eines Saccharid-Transporters mit niedriger Affinität zum Saccharid und hoher Transportkapazität für das Saccharid modifiziert wird durch das Transformieren mindestens einer Pflanzenzelle mit mindestens einem Vektor, der die Modifizierung des Saccharid-Transporters ermöglichende Nucleotidsequenzen enthält, und wobei die diese Nucleotidsequenzen stabil integriert enthaltende Pflanzenzelle zu einer Pflanze regeneriert wird, in deren Gewebe ein modifizierter Saccharid-Flux und/oder eine modifizierte Saccharid-Konzentration, jeweils im Vergleich mit einer Wildtyp-Pflanze, also einer nicht erfindungsgemäß transformierten Pflanze, vorhanden ist. Die Erfindung stellt also die Lehre bereit, einen Saccharid-Transporter mit hoher Transportkapazität für das Saccharid und mit niedriger Affinität zu dem Saccharid gezielt zu modifizieren, wobei dies mittels einer gentechnischen Manipulation der Pflanze geschieht.

Erfindungsgemäß kann dies geschehen, indem eine Pflanzenzelle mit mindestens einem die codierenden Nucleotidsequenzen des Saccharid-Transporters enthaltenden Vektor transformiert wird, der vorzugsweise nach stabiler Integration der Nucleotidsequenzen in das Genom der transformierten Zelle eine Überexpression des Saccharid-Transporters in transformiertem Gewebe ermöglicht.

Die Überexpression der erfindungsgemäß eingesetzten Nucleotidsequenz des genannten Saccharid-Transporters, z. B. in Siebelementen oder Geleitzellen, führt zu einer verstärkten Saccharose-Beladung des Phloems. Mittels der erfindungsgemäßen Verfahrensweise hergestellte Pflanzen weisen z. B. einen höheren Kohlenhydratgehalt in Sink-Organen, beispielsweise Wurzeln, Früchten, Knollen, Blüten oder Samen auf. In vorteilhafter Weise ergibt sich ein höherer Kohlenhydratgehalt insbesondere in Ernteorganen der Pflanze, die häufig Sink-Organe sind. Wird die erfindungsgemäße Verfahrensweise in einer besonders vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung bei ölhaltigen Pflanzen, z. B. Raps, eingesetzt, kann ein erhöhter Ölgehalt in den Ernteorganen festgestellt werden. Als besonders vorteilhaft erweist sich die Beobachtung, dass die Anzahl der Ernteorgane pro Pflanze gesteigert und auch deren Gewicht vergrößert werden kann.

Die erfindungsgemäß vorgesehene Überexpression des Saccharid-Transporters der genannten Art in Source-Organen kann vorteilhafterweise auch dazu führen, dass die Blütezeit der transformierten Pflanze verändert wird.

Da der Transport von Zucker im Phloem häufig reziprok mit dem Aminosäuretransport im Phloem gekoppelt ist, kann durch die erfindungsgemäß vorgesehene Erhöhung des Saccharid-Gehaltes im Phloem der unerwünschte Aminosäuregehalt in Sink-Organen, z. B. Kartoffelknollen oder Pfahlwurzeln der Zuckerrübe, gesenkt werden. Schließlich ermöglicht es die erfindungsgemäße Verfahrensweise, die Glycosylierungsrate endogen in Pflanzen vorhandener Substanzen oder auch exogen applizierter Substanzen wie Xenobiotika, z. B. Herbizide oder Pestizide, zu erhöhen und so deren Mobilität zu steigern.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die vorstehend beschriebene Überexpression in Source-Organen dadurch erreicht, dass SUT4-codierende Nucleotidsequenzen unter der Kontrolle Source-spezifischer Promotoren, also insbesondere blattspezifischer und/oder geleitzellenspezifischer Promotoren, in einen Vektor cloniert, in mindestens eine Pflanzenzelle transformiert und, vorzugsweise stabil, in das Genom der Pflanzenzelle integriert werden.

In weiteren Ausführungsformen der Erfindung kann vorgesehen sein, konstitutiv exprimierende Promotoren wie den 35SCaMV-Promotor, den geleitzellenspezifischen rolC-Promotor aus Agrobakterium oder den Enhanced PMA4-Promotor (Morian et al., Plant J (1999) 19, 31-41) einzusetzen.

Die Erfindung sieht in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform vor, die Modifizierung des Saccharid-Transports dadurch vorzunehmen, dass die Akti-

vität des Saccharid-Transporters durch Überexpression in Blattmesophyllgewebe und/oder Blattepidermis modifiziert wird. Die spezifische Expression SUT4-codierender Nucleotidsequenzen in diesen Geweben führt zu einem kompetitiven Effekt hinsichtlich des endogenen in den Siebelementen aktiven Saccharose-Transporters, so dass der Kohlenhydrat-Gehalt in den Blättern erhöht wird. Die auf diese Weise hergestellten Pflanzen haben größere Blätter, die überdies ein verbessertes Schutzpotential gegenüber Pathogenen aufweisen. Dies liegt unter anderem daran, dass Gene mit Abwehrfunktion durch einen erhöhten Zuckergehalt aktiviert werden. Zudem ergibt sich eine dickere Cuticula und ein höherer Gehalt an Sekundärmetaboliten, die unter anderem als Vorläufer für die Herstellung bioabbaubarer Kunststoffe wie PHA (Polyhydroxyalkanoate) dienen. Die in dieser bevorzugten Ausführungsform vorgesehene Expression in Blattmesophyll und -epidermis kann durch die in einer besonders bevorzugten Ausführungsform vorgesehene Verwendung des StLS1/L700 Promotors (Stockhaus et al., Plant Cell (1989) 1, 805-813), anderer epidermisspezifischer Promotoren oder des PFP-Promotors (Palisaden-Parenchym) (WO 98/18940) zur Expression der SUT4-codierenden Nucleotidsequenzen erreicht werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist vorgesehen, eine Überexpression des Saccharid-Transporters spezifisch in sink-Zellen oder Organen, insbesondere sich entwickelnden Samen einer Pflanze vorzusehen. Dadurch kann unter anderem eine verbesserte Keimungsrate erzielt werden, da sowohl der Kohlenhydrat- als

auch insbesondere der Ölgehalt der Samen erhöht wird.

Die in dieser Ausführungsform bevorzugt einzusetzenden gewebespezifischen Promotoren für die Expression der SUT4-codierenden Nucleotidsequenzen in Samengewebe sind z.B. der Vicilin-Promoter aus *Pisum sativum* (Newbigin et al., *Planta* (1990) 180, 461-470).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein vorgenanntes Verfahren vorgesehen, wobei eine Überexpression des Saccharid-Transporters durch Verwendung gewebespezifischer regulatorischer Elemente für Epidermis und Parenchym von Sink-Organen vorgesehen ist. Die verstärkte Expression des erfindungsgemäß eingesetzten Saccharid-Transporters in Sink-Organen erhöht deren Saccharid-Aufnahmekapazität und den Saccharid-Flux in das Sink-Gewebe. Erfindungsgemäß hergestellte Pflanzen weisen daher beispielsweise größere, farbigere und/oder eine höhere Zahl von Blüten, größere Samen, größere Knollen oder größere Pfahlwurzeln auf. Die Sink-Organe können sich ferner durch einen höheren Kohlenhydrat- und Ölgehalt, eine verbesserte Struktur, insbesondere Festigkeit, ein schnelleres Wachstum und/oder gegebenenfalls verbesserte Kältetoleranz aufgrund des höheren Gehalt osmotisch aktiver Substanzen auszeichnen. Zudem ist es möglich, die Blütezeit und -dauer ebenso wie die Entwicklung der Früchte zu beeinflussen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sieht die Erfindung vor, für die vorgenannte Über-

expression in Sink-Epidermis und -Parenchym den AAP-1 (Aminosäurepermease 1)-Promotor, z.B. den Arabidopsis-Promoter AtAAP1 (Expression in Endosperm und während früher Embryoentwicklung) oder AtAAP2 (Expression in Phloem des Funiculus) (Hirner et al., Plant J. (1998) 14, 535-544, den B33 (Pataatin)-Promotor (Rocha-Sosa et al., EMBO J. (1998) 8, 23-29) (Zugangsnummer: X14483; alle hier genannten Zugangsnummern beziehen sich auf folgende Genbank, falls nicht anders angegeben: National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, Bethesda, MD 20894, USA), insbesondere für Knollen und Pfahlwurzeln, den Vicilin (Speicherprotein)-Promotor aus Pisum sativum (Newbigin et al., Planta (1990) 180, 461-470) (Zugangsnr. M73805) und/oder Samen- und Blüten-spezifische Promotoren einzusetzen.

Die Erfindung betrifft auch die Modifizierung der Saccharid-Transport-Aktivität in Geweben einer Pflanze, wobei die Aktivität eines Saccharid-Transporters, insbesondere Saccharose-Transporters, mit hoher Transportkapazität für Saccharose und niedriger Affinität zu Saccharose unterdrückt oder reduziert, insbesondere inhibiert oder cosupprimiert wird.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform kann die Aktivität des Saccharid-Transports dadurch unterdrückt bzw. reduziert werden, dass Pflanzenzellen mit Vektoren transformiert werden, die den erfindungsgemäß eingesetzten Saccharid-Transporter-codierende Nucleotidsequenzen oder für eine Antisense-Repression ausreichende Teile davon in Anti-

sense-Orientierung zu einem Promotor aufweisen und vorzugsweise stabil in das Genom der Pflanzenzelle integriert werden. Die Expression dieser Antisense-RNA unterdrückt bzw. reduziert die Bildung des genannten endogen vorhandenen Saccharid-Transporters, sodass der durch diesen Transporter bewirkte Saccharid-Flux manipuliert werden kann.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann vorgesehen sein, die Aktivität dieses Saccharid-Transporters durch in die Pflanze eingeführte Cosuppressionseffekte zu reduzieren bzw. zu unterdrücken. Zur Erzielung dieser Cosuppressionseffekte werden in bevorzugter Ausführungsform mehrere Kopien eines Vektors in mindestens eine Pflanzenzelle, insbesondere stabil in deren Genom, eingebracht, der den Saccharid-Transporter-codierende Nucleotidsequenzen oder Teile davon aufweist und wobei diese Kopien im Genom integriert werden.

In einer weiteren Ausführungsform kann vorgesehen sein, die Aktivität des Saccharid-Transporters dadurch zu unterdrücken bzw. zu reduzieren, dass, vorzugsweise gewebespezifisch, endogen vorhandene, also im nicht-transformierten Wildtyp bereits vorliegende Nucleotidsequenzen des erfindungsgemäß eingesetzten Saccharid-Transporters mutagenisiert werden, beispielsweise durch Transposonmutagenese.

Schließlich kann erfindungsgemäß vorgesehen sein, die Aktivität oder Expression des Saccharose-Transporters durch RNA-Doppelstrang-Inhibierung zu reduzieren oder zu unterdrücken.

- 15 -

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die vorgenannten Techniken zur Unterdrückung oder Reduzierung der Aktivität des Saccharid-Transporters mit geringer Affinität zu Saccharose, aber hoher Saccharose-Transportkapazität eingesetzt, um beispielsweise in Source-Geweben, z. B. Blättern, einen höheren Gehalt an Kohlenhydraten, insbesondere Saccharose, aufzubauen. Dies kann in besonderer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung durch vorstehend beschriebene Reduzierung oder Unterdrückung der Saccharid-Transportkapazität in Source-Organen geschehen. Dadurch wird die Struktur und Festigkeit von Sink-Organen reduziert, während der Saccharose- bzw. Kohlenhydratgehalt in Source-Organen ansteigt. Hierdurch kann eine höhere Süße von Ernteorganen bestimmter Pflanzen erreicht werden, deren Blätter als Nahrungsmittel dienen, z. B. Salat oder Spinat. Zudem können -durch Konkurrenz erzielte- Vorteile erreicht werden, wie sie vorstehend bereits für die Überexpression des Saccharid-Transporters in Blattmesophyll und Epidermis beschrieben wurden. Schließlich kann durch den reduzierten Saccharose-Flux in den Stamm einer Pflanze dessen Länge reduziert werden, was insbesondere für die Herstellung von Zwergvarianten von Pflanzen, z. B. bei bestimmten Apfelsorten, oder ähnlichem wünschenswert ist.

In einer weiteren Ausführungsform kann vorgesehen sein, die Aktivität des Saccharid-Transporters in den Schließzellen zu unterdrücken oder zu reduzieren, beispielsweise durch in Schließzellen vorgenommene Mutagenese endogen vorhandener Nucleotidsequenzen, die den Saccharid-Transporter codieren,

durch Cosuppressions-Effekte, RNA-Doppelstrang-Inhibierung oder durch Verwendung von Antisense-Konstrukten. Durch die Modifizierung von Saccharid-Transportvorgängen und den damit verbundenen Veränderungen in der Bereitstellung von Energie und osmotisch aktiven Stoffen in Schließzellen kann die Kapazität zur Öffnung oder zum Schließen der Stomata geändert werden, insbesondere erhöht oder reduziert werden. Eine höhere Öffnungsrate der Stomata erlaubt eine verbesserte Zufuhr für CO₂, so dass die Photosyntheserate verbessert wird. Wird erfindungsgemäß das Öffnen der Stomata verhindert oder in seiner Frequenz reduziert, kann eine erhöhte Trockenresistenz der Pflanze erzielt werden. In besonders bevorzugter Weise wird für die Erzielung der vorgenannten Effekte ein Vektor verwendet, in dem den erfindungsgemäß eingesetzten Saccharid-Transporter-codierende Nucleotidsequenzen in Sense- oder Antisense-Orientierung z. B. unter der Kontrolle eines Schließzellen-spezifischen Promotors, z. B. des KAT1-Promotors (Nakamura et al., Plant Physiol. (1995) 109, 371-374) stehen.

Da der Saccharidtransporter SUT4 auch in sink-Organen exprimiert wird, kann vorgesehen sein, den Saccharid-Import in die sink-Zellen oder Organe oder bevorzugt in bestimmte sink-Zellen oder Organe, besonders bevorzugt in die Blüte zu reduzieren. Dadurch kann erreicht werden, daß in Source-Zellen oder Organen Kohlenhydrate akkumulieren, die für andere Synthesewege nützlich sind und es kann die relative Aktivität einzelner sink-Zellen zugunsten anderer verschoben werden um somit die Erträge qualitativ und quantitativ zu verbessern.

- 17 -

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ferner vorgesehen, die vorgenannten Verfahren durchzuführen, wobei zusätzlich zu den oder anstelle der den erfindungsgemäß eingesetzten Saccharid-, insbesondere Saccharose-Transporter, besonders bevorzugt SUT4-codierenden Nucleotidsequenzen weitere Nucleotidsequenzen zur Transformation verwendet werden, die im funktionellen Zusammenhang mit der Saccharose-Konzentration und dem Saccharose-Flux in Geweben eine Pflanze stehen.

In besonders bevorzugter Ausführungsform sind dies Nucleotidsequenzen, die SUT1 oder SUT2 codieren, z. B. genomische oder cDNA-Nucleotidsequenzen.

SUT1 genomische und cDNA-Sequenzen sind z. B. aus der WO94/00574 (Kartoffel, Spinat), Riesmeier et al., a. a. O. (Kartoffel), Riesmeier et al., (EMBO J. (1992)11, 4705-4713 (Spinat)), Bürkle et al., (Plant Physiol. (1998)118, 59-68 (Tabak)), Hirose et al., (Plant Cell Physiol. (1997)38, 1389-1396 (Reis)), Weig und Komor (J. Plant Physiol. (1996)147, 685-690 (Ricinus)), Weber et al., (The Plant Cell (1997)9, 895-908 (Vicia faba)), Shakya und Sturm (Plant Physiol. (1998)118, 1473-1480 (Karotte)), Tegeder et al. (The Plant Journal (1999) Plant J. (1999) 18,151-161 (Pisum sativum)), Noiraud et al. (Poster abstract 11th Inter. Workshop on Plant Membrane Biology, Cambridge, UK (1998) (Apium graveolens)), Picaud et al., (Poster abstract 11th Inter. Workshop on Plant Membrane Biology, Cambridge, UK (1998) (Vitis vinifera)) und Zuckerrübe (Zugangsnummer: X83850) bekannt, die

hinsichtlich der Nucleotidsequenzen, der Aminosäuresequenz von SUT1 und deren Gewinnung vollständig in den Offenbarungsgehalt der vorliegenden Lehre mit einbezogen sind und für die im Zusammenhang mit der vorliegenden Lehre auch Schutz begehrt wird. Erfindungsgemäß eingesetzte SUT1-codierende Nucleotidsequenzen ebenso wie die davon abgeleitete Aminosäuresequenz, dargestellt in SEQ ID Nr. 22 und 23 sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. SUT1 stellt einen Saccharose-Transporter mit hoher Affinität zu Saccharose, aber geringer Transportkapazität für Saccharose dar. Eine Coexpression von Saccharose-Transportern mit unterschiedlichen Affinitäten zu Saccharose in ein und demselben Gewebe, z.B. in Siebelementen, erlaubt eine regulierte und den tatsächlichen in der Pflanze vorhandenen Gegebenheiten gerecht werdende Manipulation des Saccharose-Fluxes.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird ein Vektor zur Transformation der mindestens einen Pflanzenzelle verwendet, der SUT2-codierende Nucleotidsequenzen aufweist. SUT2 fungiert erfindungsgemäß insbesondere als Regulator und Sensor. SUT2 weist überdies die biologische Aktivität eines niedrig affinen Saccharose-Transports auf. Die Transport-Raten von SUT2 sind ebenfalls niedrig. Ohne durch die Theorie gebunden zu sein, ist SUT2 ein Regulator und/oder Sensor des Saccharose-Transporters, der insbesondere seine eigene Transportaktivität feststellen und gegebenenfalls weiter vermitteln kann. Seine Transportaktivität kann einerseits als funktionaler Bestandteil seiner Sensoraktivität und andererseits

kann seine Sensoraktivität als funktionaler Bestandteil seiner Transportaktivität angesehen werden. SUT2 mit seiner niedrigen Affinität für Saccharose ist erfindungsgemäß ein Flux-Sensor, der möglicherweise ein Substrat, nämlich Saccharose, transportiert und eine Signalkaskade verwendet beziehungsweise Bestandteil selbiger darstellt, die die Transportrate misst. Die Affinität von SUT2 für Saccharose ist geringer als die von SUT4. Erfindungsgemäß konnte in besonders bevorzugter Ausführungsform gezeigt werden, dass die N-Termini von Proteinen der SUT/SUC-Genfamilie eine modifizierte Affinität gegenüber ihrem Substrat, insbesondere Saccharose vermitteln. Insbesondere die N-Termini von SUT2, aber auch von SUT1 vermitteln eine modifizierte Saccharose-Affinität, im Fall von SUT2 niedrige und im Fall von SUT1 hohe Affinität für Saccharose.

Die Erfindung betrifft daher auch die Verwendung von N-Termini von Saccharose-Transportern beziehungsweise diese codierender Nucleotidsequenzen, insbesondere pflanzlichen Saccharose-Transportern zur Modifizierung des Saccharose-Transports oder des Saccharose-Sensings in Pflanzen, insbesondere zur Herstellung modifizierter Saccharose-Transporter und -Sensoren mit modifizierter Affinität für Saccharose in Pflanzen.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung von SUT2 und/oder SUT2-codierenden DNA-Sequenzen, insbesondere des SUT2-loops als Regulator und Sensor des Saccharose-Transports, insbesondere zur Regulation der SUT4- und/oder SUT1-Aktivität z.B. in Pflanzen-

- 20 -

oder Pilzzellen. Überdies konnte erfindungsgemäß gezeigt werden, dass SUT2 durch Saccharose induzierbar ist. SUT2 reguliert die relative Aktivität von in demselben Zelltyp, z. B. in den Siebelementen, vorhandenen Saccharose-Transportern. Insbesondere reguliert SUT2 die Aktivität des Saccharose-Transporters SUT1, der hohe Saccharose-Affinität, aber geringe Transportkapazität aufweist und den SUT4-Saccharose-Transporter mit hoher Transportkapazität, aber geringer Saccharose-Affinität. Diese Regulation kann über die Kontrolle der Expression, der Proteinaktivität, z. B. durch Proteinmodifikation oder der turnover-Rate von mRNA oder Protein erfolgen und in einer Aktivitätssteigerung oder -reduzierung resultieren. SUT2 wird in Pflanzen insbesondere in den großen Blattadern ausgewachsener Blätter, Blüten und Sink-Organen exprimiert.

Die Erfindung betrifft daher auch die vorgenannten N-Termini und Zentralschleifen beziehungsweise Loops von Proteinen aus der SUT/SUC-Genfamilie, insbesondere von SUT1, SUT2 und/oder SUT4 sowie die diese Bereiche codierenden Nucleotidsequenzen. Diese sind in bevorzugter Ausführungsform dargestellt in SEQ ID Nr. 24, 25 und 26. Die N-Termini von LeSUT2 (*Lycopersicon esculentum*) und StSUT2 (*Solanum tuberosum*) umfassen die ersten 62 Aminosäuren des Proteins und sind codiert durch die Nucleotide 1 bis 186 von SEQ ID Nr. 4 (*Lycopersicon esculentum*) beziehungsweise Nr. 29 (*Solanum tuberosum*). Die Zentralschleife von LeSUT2 wird durch die Nucleotide 844 bis 1131 von SEQ ID Nr. 4 und von StSUT2 durch die Nucleotide 847 bis 1134 von SEQ ID Nr. 29 codiert.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, die, vorzugsweise in einem Vektor, angeordneten SUT1-, SUT4- und/oder SUT2-codierenden Sequenzen in Sense- oder Antisense-Orientierung zu mindestens einem regulatorischen Element, insbesondere einem Promotor, z. B. je nach gewünschter Gewebespezifität einen der vorgenannten Promotoren, in Pflanzenzellen zu transformieren, wobei nach Integration im Genom und Expression des Produktes die Aktivität von cotransformierten und/oder endogen vorhandenen SUT4 modifiziert wird.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft diese ein vorgenanntes Verfahren, wobei ein Vektor in die Pflanzenzelle transformiert wird, welcher SUT2-codierende Nucleotidsequenzen enthält, vorzugsweise in Sense- oder Antisenseorientierung unter der operativen Kontrollen eines regulatorischen Elementes, insbesondere eines Promotors. Es kann dabei vorgesehen sein, den die SUT2-codierenden Nucleotidsequenzen enthaltenden Vektor ohne weitere Vektoren, die z. B. SUT4- oder SUT1-codierende Nucleotidsequenzen enthalten, zu transformieren. Die Transformation, Integration und Expression der SUT2-codierenden Nucleotidsequenzen führt aufgrund der erfindungsgemäßen Lehre, dass SUT2 insbesondere ein Saccharosekonzentrations-Sensor und -regulator mit den vorstehend genannten Transportereigenschaften sowie Saccharose-Flux-Sensor und -regulator ist, zu einer Modifizierung der Aktivität des Saccharosetransports in der transformierten Pflanze, insbesondere der endogen vorhandenen Saccharose-Transporter, nämlich SUT4 oder/und SUT1. Diese Re-

- 22 -

gulation kann auf transkriptionellem oder posttranskriptionellem Niveau erfolgen, beispielsweise durch direkte Proteininteraktion oder indirekt über Signaltransduktion.

Selbstverständlich betrifft die Erfindung auch die Verwendung der SUT2-codierenden Nucleotidsequenzen oder von Teilen davon, insbesondere der den N-terminalen Proteinbereich codierenden Nucleotidsequenz, zur Transformation von Pflanzenzellen, wobei diese zusammen mit SUT1- und/oder SUT4-codierenden Nucleotidsequenzen transformiert werden können. Auch in einem solchen Fall kann die Überexpression, Cosuppression oder Antisense-Repression von SUT2 die Aktivität von SUT1 und/oder SUT4 modifizieren, z. B. erhöhen oder reduzieren. In besonders bevorzugter Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann vorgesehen sein, Teile der SUT2-codierenden Nucleotidsequenzen, insbesondere die den N-terminalen Proteinbereich codierenden Nucleotidsequenzen von SUT2 (SEQ ID Nr. 24) oder die den zentralen, cytoplasmatischen Loop-codierenden Nucleotidsequenzen (SEQ ID Nr. 26) im Rahmen von chimären Genkonstrukten einzusetzen, die Proteine mit der biologischen Aktivität eines Saccharose-Transporters codieren und zum Beispiel als N-Terminus beispielsweise die SUT2 codierenden Nucleotidsequenzen sowie im Zentralbereich und am C-terminalen Ende Nucleotidsequenzen eines anderen Saccharose-Transporters, zum Beispiel von SUT1 oder SUT4 aufweisen. Derartige SUT2-Nucleotidsequenzen, die SUT2, oder Teile von SUT2 enthalten, werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch als modifizierte SUT2-Nucleotidsequenzen bezeichnet.

Als Regulator interagiert SUT2 mit anderen Proteinen, insbesondere mit Regulatoren, Signaltransduktionsfaktoren und anderen Saccharosetransportern. Daher können unter Nutzung von SUT2 durch Interaktionsklonierung weitere Regulatoren identifiziert werden, für die ebenfalls Schutz begehrt wird.

Die Erfindung betrifft auch, vorzugsweise isolierte und gereinigte, Regulatorproteine und Sensorproteine sowie diese codierende Nucleotidsequenzen, die die zentrale cytoplasmatische Schleife von SUT2 enthalten, insbesondere chimäre Proteine und Nukleinsäuren mit N- und C-terminalen Bereichen von anderen Saccharosetransportern, beziehungsweise diese codierende Nucleotidsequenzen, wobei diese chimären Proteine beziehungsweise Nucleinsäuren die Zentralschleife (loop) von SUT2 enthalten. Dem zentralen cytoplasmatischen Loop oder Schleife kommt eine biologische Aktivität als Regulatorelement und/oder Sensor und/oder Signaltransduktor zu.

Die Erfindung betrifft in einer Ausführungsform also die vorgenannten Verfahren zur Modifizierung der Aktivität eines Saccharose-Transporters mit niedriger Affinität zu Saccharose, aber hoher Transportaktivität für Saccharose im Rahmen dessen bekannte bzw. modifizierte SUT4-, SUT1- und/oder SUT2-codierende Nucleotidsequenzen eingesetzt werden, um die Modifizierung zu erreichen und eine verbesserte transgene Pflanze zu erhalten.

Die Erfindung betrifft also in einer weiteren Ausführungsform auch Verfahren zur Herstellung transgener, modifizierter Pflanzen, die eine veränderte

Aktivität des genannten Saccharose-Transporters aufweisen und, vorzugsweise stabil im Genom integriert, modifizierte SUT1-, SUT2- und/oder SUT4-Nucleotidsequenzen enthalten. Die Erfindung betrifft auch die so hergestellten transgenen Pflanzen, Pflanzenzellen, Organe oder Teile von Organen und Pflanzen, die sich durch die veränderte Aktivität des genannten Saccharose-Transporters auszeichnen und mindestens eine der genannten Nucleotidsequenzen ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den Nucleotidsequenzen, insbesondere Genen für Saccharid-Transporter, wie SUT- und SUC-Genen, vorzugsweise für SUT1; SUT2; SUT4; SUT1 und SUT2; SUT1 und SUT4; SUT2 und SUT4; SUT1 und SUT2 und SUT4 in modifizierter Form enthalten. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer modifizierten Nucleotidsequenz eine von der Wildtyp-Sequenz, insbesondere dem Wildtypgen, abweichende Nucleotidsequenz verstanden, beispielsweise eine Abweichung, die auf Nucleotidinsertionen, -inversionen, -deletionen, -austauschen, -additionen oder ähnlichem beruhen. Beispielsweise stellen modifizierte Nucleotidsequenzen auch solche Gene dar, die die codierende Nucleotidsequenz des Wildtypes enthalten, wobei diese codierende Nucleotidsequenz operativ in Sense- oder Antisense-Orientierung mit einem heterologen Promotor z. B. einem gewebespezifischen oder konstitutiv exprimierenden Promotor verknüpft sind. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung kann eine modifizierte Nucleotidsequenz auch dann vorliegen, wenn sie exakt der Wildtyp-Sequenz entspricht, jedoch in zusätzlicher Kopienzahl oder/und an einem anderen Ort im Genom als die natürlicherweise vorkommende Sequenz vorliegt.

Eine modifizierte Nucleotidsequenz liegt auch dann vor, wenn die natürlicherweise endogen vorkommenden Nucleotidsequenz durch Mutagenese, beispielsweise Transposon-Mutagenese, geändert wurde. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter modifizierten Genen also solche Nucleotidsequenzen verstanden, die in der Nucleotidsequenz ihrer regulatorischen und/oder Protein-codierenden Bereiche Abweichungen, z. B. Insertionen, Additionen, Deletionen, Austausch oder ähnliches gegenüber der Wildtypsequenz enthalten, also auch als Mutanten, Derivate oder funktionelle Äquivalente bezeichnet werden können. Modifizierte Nucleotidsequenzen beziehungsweise modifizierte Gene können auch chimäre Nucleotidsequenzen oder Gene sein, also beispielsweise solche Protein codierende Bereiche, die sich aus zwei oder mehreren unterschiedlichen natürlicherweise nicht zusammen vorkommenden Nucleotidsequenzen zusammensetzen, beispielsweise Konstrukte, die als N-terminale Nukleotidsequenz SUT2 codierende Sequenzen (SEQ ID Nr. 24) und als Zentral- und 3'-terminalen Bereich SUT1-codierenden Sequenzen aufweisen. Erfindungsgemäß werden unter modifizierten Genen aber auch solche verstanden, die als 5'-codierenden Bereich Sequenzen des SUT1-Genes (zum Beispiel SEQ ID Nr. 25) und als Mittelbereich oder/und 3'-Bereich Sequenzen des SUT2-Gens enthalten.

Modifizierte Gene können demgemäss z. B. die Wildtyp-codierenden Sequenzen und heterologe Promotoren z. B. aus anderen Organismen oder von anderen Genen enthalten.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einem Gen eine unter der operativen Kontrolle mindestens eines regulatorischen Elementes stehende Protein-codierende Nucleotidsequenz verstanden.

Die Erfindung betrifft auch Mittel zur Modifizierung des Saccharose-Transports. Diese Mittel sind Nucleinsäuremoleküle, codierend einen Saccharid-Transporter mit niedriger Saccharid-Affinität und hoher Transportkapazität für das Saccharid oder Teile davon, insbesondere Saccharose, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- a) Nucleinsäuremolekülen, die die unter SEQ ID Nr. 1, 2 oder 27 dargestellte Nucleotidsequenz umfassen, eines Teils oder eines komplementären Strangs davon,
- b) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein mit der unter SEQ ID Nr. 5, 6 oder 28 dargestellten Aminosäuresequenz codieren und
- c) Nucleinsäuremolekülen, die mit einem der unter a) und b) genannten Nucleinsäuremolekülen hybridisieren.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist der Saccharid-Transporter ein Saccharose-Transporter, insbesondere SUT4, z. B. aus Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*, At), Tomate (*Lycopersicon esculentum*, Le) oder Kartoffel (*Solanum tuberosum*, St). Die vorgenannten Nucleinsäuremoleküle werden auch als SUT4-codierende Sequenzen bezeichnet.

Die Erfindung betrifft auch Nucleinsäuremoleküle, codierend einen Sensor und/oder Regulator für den Saccharose-Transport in Pflanzen und mit den Eigenschaften eines niedrig affinen Saccharose-Transporters mit niedrigen Transport-Raten oder Teile davon, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- a) Nucleinsäuremolekülen, die die unter SEQ ID Nr. 3, 4, 24, 26 oder 29 dargestellte Nucleotidsequenz umfassen, eines Teils oder eines komplementären Strangs davon,
- b) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein mit der unter SEQ ID Nr. 7, 8 oder 30 dargestellten Aminosäuresequenz codieren und
- c) Nucleinsäuremolekülen, die mit einem der unter a) und b) genannten Nucleinsäuremolekülen hybridisieren.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist der Saccharid-Sensor und/oder -Regulator ein Saccharose-Sensor und/oder Regulator, insbesondere SUT2, z.B. aus Kartoffel, Tomate oder Arabidopsis. Die vorgenannten Nucleinsäuremolekülen werden auch als SUT2 codierende Sequenzen bezeichnet.

Die erfindungsgemäßen oder erfindungsgemäß eingesetzten Nucleinsäuremoleküle können aus natürlichen Quellen isoliert und gereinigt werden, vorzugsweise aus der Kartoffel, oder sie können nach bekannten Verfahren synthetisiert werden. Mittels gängiger molekularbiologischer Techniken ist es möglich, verschiedenartige Mutationen in die erfindungsgemäßen oder die bereits bekannten erfindungsgemäß ein-

gesetzten Nucleinsäuremoleküle einzufügen, wodurch es zur Synthese von Proteinen mit eventuell veränderten biologischen Eigenschaften kommt, die ebenfalls von der Erfindung erfasst werden. Mutationen im Sinne der Erfindung betreffen auch alle Deletionsmutationen, die zu verkürzten Proteinen führen. Durch andere molekulare Mechanismen wie Insertionen, Duplikationen, Transpositionen, Genfusion, Nucleotidaustausch aber auch durch Gentransfer zwischen verschiedenen Mikroorganismenstämmen und andere kann es beispielsweise zu Modifikationen der Aktivität und/oder der Regulierung des Proteins kommen. Auf diese Weise können beispielsweise mutante Proteine hergestellt werden, die eine veränderte Transportkapazität oder Saccharose-Affinität besitzen und/oder den normalerweise in den Zellen vorliegenden Regulationsmechanismen nicht mehr oder in veränderter Form unterliegen. Des weiteren können erfindungsgemäß mutante Proteine hergestellt werden, die eine veränderte Stabilität, Substratspezifität oder ein verändertes Effektorenmuster oder ein modifiziertes Aktivitäts-, Temperatur-, pH-Wert- und/oder Konzentrations-Profil aufweisen. Weiterhin bezieht sich die erfindungsgemäße Lehre auf Proteine, die eine veränderte aktive Proteinkonzentration, prä- und posttranslationelle Modifikationen zum Beispiel Signal- und/oder Transportpeptide und/oder andere funktionelle Gruppen aufweisen.

Die Erfindung betrifft auch Nucleinsäuremoleküle, die mit den vorgenannten erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisieren. Hybridisierung bedeutet im Rahmen der Erfindung eine Hybridisierung un-

ter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, wie sie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2. Ausgabe, 1989) beschrieben sind, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen. Gemäß vorliegender Erfindung spricht man von einer Hybridisierung, wenn nach Waschen für 15 Minuten mit 2 x SSC und 0,1% SDS bei 52°C, vorzugsweise bei 60°C und besonders bevorzugt bei 65°C, insbesondere für 15 Minuten in 0,5 x SSC und 0,1 % SDS bei 52°C, vorzugsweise bei 60°C und besonders bevorzugt bei 65°C noch ein positives Hybridisierungssignal beobachtet wird. Eine unter derartigen Waschbedingungen mit einer der in den Sequenzprotokollen angegebenen Nucleotidsequenzen hybridisierende Nucleotidsequenz ist eine erfindungsgemäße Nucleotidsequenz.

Die Identifizierung und Isolierung derartiger Nucleinsäuremoleküle kann dabei unter Verwendung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder von Teilen dieser Moleküle beziehungsweise des komplementären Stranges erfolgen. Als Hybridisierungsprobe können zum Beispiel Nucleinsäuremoleküle verwendet werden, die exakt die oder im wesentlichen die unter SEQ ID Nr. 1, 2, 3 oder 4 dargestellten Nucleotidsequenzen oder Teile dieser Sequenz aufweisen. Bei den als Hybridisierungsprobe verwendeten Fragmenten kann es sich auch um synthetische Fragmente handeln, die mit Hilfe üblicher Synthesetechniken hergestellt werden und deren Sequenz im wesentlichen mit der eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls übereinstimmt. Die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisierenden Moleküle umfassen auch Fragmente, Derivate und al-

- 30 -

allelische Varianten der oben beschriebenen Nucleinsäuremoleküle, die ein erfindungsgemäßes Protein codieren. Unter "Fragmenten" werden dabei Teile der Nucleinsäuremoleküle verstanden, die lang genug sind, um das beschriebene Protein zu codieren. Der Ausdruck "Derivat" bedeutet im Zusammenhang mit der Erfindung, dass sich die Sequenzen dieser Moleküle von den Sequenzen der oben beschriebenen Nucleinsäuremoleküle an einer oder mehreren Positionen unterscheiden, aber einen hohen Grad an Homologie zu diesen Sequenzen aufweisen. Homologie bedeutet dabei eine Sequenzidentität von mindestens 70 %, insbesondere eine Identität von mindestens 75 %, vorzugsweise über 80 % und besonders bevorzugt über 90 %, 95 %, 97 % oder 99 % auf Nukleinsäureebene. Dabei weisen die durch diese Nucleinsäuremoleküle codierten Proteine eine Sequenzidentität zu der in SEQ ID Nr. 5, 6, 7 oder 8 angegebenen Aminosäuresequenz von mindestens 80 %, vorzugsweise 85 % und besonders bevorzugt von über 90 %, 95 %, 97 % und 99 % auf Aminosäureebene auf. Die Abweichungen zu den oben beschriebenen Nucleinsäuremolekülen können dabei beispielsweise durch Deletion, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein. Es kann sich dabei sowohl um natürlicherweise auftretende Variationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus anderen Organismen, oder um Mutationen, wobei diese Mutationen auf natürliche Weise auftreten sein können oder durch gezielte Mutagenese (UV- oder Röntgenstrahlen, chemische Agenzien oder andere) eingeführt wurden. Ferner kann es sich bei den Variationen um synthetisch hergestellte Sequenzen handeln. Bei den allelischen Varianten kann es sich sowohl um natürlich auftretende Varianten han-

deln, als auch um synthetisch hergestellte oder durch rekombinante DNA-Techniken erzeugte Varianten. Die von den verschiedenen Varianten der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codierten Proteine weisen bestimmte gemeinsame Charakteristika auf, wie Aktivität, aktive Proteinkonzentration, posttranslationelle Modifikationen, funktionelle Gruppen, Molekulargewicht, immunologische Reaktivität, Konformation und/oder physikalische Eigenschaften, wie das Laufverhalten in Gelelektrophoresen, chromatographisches Verhalten, Sedimentationskoeffizienten, Löslichkeit, spektroskopische Eigenschaften, Stabilität, pH-Wert-Optimum, isoelektrischer pH-Wert, Temperatur-Optimum und/oder andere.

Bei den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen kann es sich sowohl um DNA- als auch um RNA-Moleküle handeln. Erfindungsgemäße DNA-Moleküle sind beispielsweise genomische DNA oder cDNA-Moleküle.

Die Erfindung betrifft ferner Vektoren, die erfindungsgemäße Nucleinsäuremoleküle enthalten.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung können Vektoren z. B. Plasmide, Liposomen, Cosmide, Viren, Bacteriophagen, Shuttle-Vektoren und andere in der Gentechnik übliche Vektoren sein. Die Vektoren können noch weitere Funktionseinheiten besitzen, die eine Stabilisierung und/oder Replikation des Vektors in einem Wirtsorganismus bewirken oder dazu beitragen.

- 32 -

In einer besonderen Ausführungsform werden erfindungsgemäß auch die Vektoren erfasst, bei denen das in ihnen enthaltene Nucleinsäuremolekül mit mindestens einem regulatorischen Element operativ verbunden ist, das die Transcription und Synthese translatierbarer Nucleinsäuremoleküle in pro- und/oder eucaryotischen Zellen gewährleistet. Derartige regulatorische Elemente können Promotoren, Enhancer, Operatoren und/oder Transcriptionsterminationssignale sein. Selbstverständlich können die Vektoren auch Antibiotikum-Resistenzgene, Herbizidresistenzgene also z. B. Selektionsmarker, enthalten.

Die Erfindung betrifft in einer bevorzugten Ausführungsform auch die vorgenannten Vektoren, wobei diese neben der unter Kontrolle mindestens eines regulatorischen Elementes stehenden Nucleinsäuresequenzen, welche das erfindungsgemäße SUT4 und/oder SUT2 codieren, eine ebenfalls unter der Kontrolle mindestens eines regulatorischen Elementes stehende Nucleinsäuresequenz enthält, die SUT1 codiert. Ein derartiger Vektor weist also die genetische Information für mindestens zwei mit dem Saccharose-Transport befasste Proteine auf. Solche Vektoren erlauben es in besonders einfacher Weise, gezielt und umfassend das System des Saccharose-Transports in einer Pflanze zu modifizieren.

Die Erfindung betrifft auch Wirtszellen, die eines der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder einen der erfindungsgemäßen Vektoren stabil integriert oder transient beinhalten beziehungsweise mit diesem transformiert sind und vorzugsweise in der Lage sind, SUT4 und gegebenenfalls SUT1 und/oder

SUT2 zu exprimieren. Weiterhin betrifft die Erfindung Wirtszellen, die von einer mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen oder den erfindungsgemäßen Vektoren transformierten Wirtszelle abstammen. Die Erfindung betrifft also Wirtszellen, die die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder Vektoren enthalten, wobei unter einer Wirtszelle ein Organismus verstanden wird, der in der Lage ist, *in vitro* rekombinante Nucleinsäuremoleküle aufzunehmen und gegebenenfalls die von den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen codierten Proteine zu synthetisieren. Vorzugsweise sind dies procaryotische oder eucaryotische Zellen. Vor allem betrifft die Erfindung Mikroorganismen, die die erfindungsgemäßen Vektoren, Derivate oder Teile der Vektoren enthalten, die diese zu einer Synthese von Proteinen mit Saccharose-Transportaktivität befähigen. Die erfindungsgemäße Wirtszelle kann auch dadurch gekennzeichnet sein, dass das eingeführte erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül entweder heterolog in bezug auf die transformierte Zelle ist, das heißt natürlicherweise nicht in dieser Zelle vorkommt, oder aber an einem anderen Ort oder einer anderen Kopienzahl im Genom lokalisiert ist als die entsprechende natürlicherweise auftretende Sequenz.

In einer Ausführungsform der Erfindung ist diese Wirtszelle also eine procaryotische Zelle, vorzugsweise eine gram-negative procaryotische Zelle, besonders bevorzugt eine Enterobakterienzelle. Die Transformation procaryotischer Zellen mit exogenen Nucleinsäuresequenzen ist einem Fachmann auf dem Gebiet der Molekularbiologie geläufig.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann die erfindungsgemäße Zelle jedoch auch eine eucaryotische Zelle sein, wie eine Pflanzenzelle, eine Pilzzelle, zum Beispiel Hefe oder eine tierische Zelle. Verfahren zur Transformation beziehungsweise Transfektion eucaryotischer Zellen mit exogenen Nucleinsäuresequenzen sind dem Fachmann auf dem Gebiet der Molekularbiologie geläufig.

Die Erfindung betrifft auch Zellkulturen oder Kallusgewebe, die mindestens eine der erfindungsgemäßen Wirtszellen aufweisen, wobei die erfindungsgemäße Zellkultur oder des Kallus insbesondere in der Lage ist, ein Protein mit Saccharose-Transportaktivität zu produzieren.

In einer Ausführungsform der Erfindung ist die erfindungsgemäß eingesetzte Nucleotidsequenz im Vektor verknüpft mit einem Nucleinsäuremolekül, das eine funktionale Signalsequenz zur Weiterleitung des Proteins an unterschiedliche Zellkompartimente oder die Plasmamembran codiert. Diese Modifikation kann beispielsweise in einer Addition einer N-terminalen Signalsequenz einer höheren Pflanze bestehen, aber auch jede andere Modifikation, die zur Fusion einer Signalsequenz an das codierte Protein führt, ist Gegenstand der Erfindung.

Die Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in procaryotischen Zellen, beispielsweise in *Escherichia coli*, oder in eucaryotischen Zellen, z.B. in Hefe, ist insofern interessant, als dass auf diese Weise z. B. eine genauere Charakterisie-

rung der Aktivitäten der Proteine, die von diesen Moleküle codiert werden, ermöglicht wird.

Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform sind, vorzugsweise gereinigte und isolierte Peptide oder Proteine, codiert durch die erfindungsgemäßen Nucleotidsequenzen, insbesondere mit den Aminosäuresequenzen der SEQ ID Nr. 5 bis 8, 23 bis 26, 28 oder 30, vorzugsweise mit der Aktivität eines Saccharose-Transporters, insbesondere eines Saccharose-Transporters mit geringer Affinität gegenüber Saccharose und hoher Transportkapazität für Saccharose, beziehungsweise mit der Aktivität eines Sensors oder Regulators des Saccharosetransports sowie Verfahren zu deren Herstellung, wobei eine erfindungsgemäße Wirtszelle unter Bedingungen kultiviert wird, die die Synthese des Proteins erlauben und anschließend das Protein aus den kultivierten Zellen und/oder dem Kulturmedium isoliert wird.

Ferner betrifft die Erfindung die mit diesen Proteinen spezifisch reagierenden monoclonalen oder polyclonalen Antikörper.

Durch die Bereitstellung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle ist es möglich, mit Hilfe gentechnischer Methoden den Saccharose-Transport in Geweben einer beliebigen Pflanze so zu modifizieren, wie es durch konventionelle, z. B. züchterische Maßnahmen bei Pflanzen nicht möglich war, und ihn dahingehend zu verändern, dass es zur gezielten Saccharose-Konzentrationsänderung in bestimmten Geweben einer Pflanze kommt. Durch eine Erhöhung der Aktivität der erfindungsgemäßen Proteine, bei-

- 36 -

spielsweise durch Überexpression entsprechender Nucleinsäuremoleküle, oder durch die Bereitstellung von Mutanten, die nicht mehr den zelleigenen Regulationsmechanismen unterliegen und/oder unterschiedlicher Temperaturabhängigkeiten in bezug auf ihre Aktivitäten besitzen, besteht die Möglichkeit der Ertragssteigerung in entsprechend gentechnisch veränderten Pflanzen. Möglich ist somit die Expression der erfindungsgemäß eingesetzten Nucleinsäuremoleküle in pflanzlichen Zellen, um die Aktivität der entsprechenden Saccharose-Transporter zu erhöhen, oder die Expression in Zellen, die dieses Protein normalerweise nicht exprimieren. Ferner ist es möglich, die erfindungsgemäß eingesetzten Nucleinsäuremoleküle nach dem Fachmann bekannten Methoden zu modifizieren, um erfindungsgemäße Proteine zu erhalten, die nicht mehr den zelleigenen Regulationsmechanismen unterliegen, bzw. veränderte Temperaturabhängigkeiten oder Substrat- bzw. Produktspezifitäten aufweisen. Die Erfindung sieht auch vor, dass das synthetisierte Protein in jedem beliebigen Kompartiment oder der Plasmamembran der pflanzlichen Zelle lokalisiert sein kann. Um die Lokalisierung in einem bestimmten Kompartiment bzw. der Plasmamembran zu erreichen, muss die codierende Region gegebenenfalls mit DNA-Sequenzen verknüpft werden, die die Lokalisierung in dem jeweiligen Kompartiment bzw. der Plasmamembran gewährleisten. Derartige Sequenzen sind bekannt (siehe beispielsweise Braun et al., EMBO J. (1992)11, 3219-3227; Wolter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988)85, 846-850; Sonnewald et al., Plant S. (1991)1, 95-106).

Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch transgene Pflanzenzellen, die mit einem oder mehreren erfindungsgemäßen oder erfindungsgemäß eingesetzten Nucleinsäuremolekül(en) transformiert wurden, sowie transgene Pflanzenzellen, die von derartigen transformierten Zellen abstammen. Derartige Zellen enthalten ein oder mehrere erfindungsgemäß eingesetzte oder erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül(e), wobei diese(s) vorzugsweise mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft ist/sind, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten, insbesondere mit einem Promotor. Die Erfindung betrifft auch transgene Pflanzenzellen, deren Genom mindestens zwei stabil integrierte modifizierte Gene aus der Familie der SUT- und/oder SUC-Gene enthält. Derartige Zellen lassen sich von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen dadurch unterscheiden, dass sie mindestens ein erfindungsgemäßes oder erfindungsgemäß eingesetztes Nucleinsäuremolekül enthalten, das natürlicherweise in diesen Zellen nicht vorkommt, oder dadurch, dass ein solches Molekül an einem Ort im Genom der Zelle integriert vorliegt, an dem es natürlicherweise nicht vorkommt, d. h. in einer anderen genomischen Umgebung oder in einer anderen als der natürlichen Kopienzahl vorliegt. Die transgenen Pflanzenzellen können nach dem Fachmann bekannten Techniken zu ganzen Pflanzen regeneriert werden. Die durch Regeneration der erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen erhältlichen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Die Erfindung betrifft auch Pflanzen, die mindestens eine, bevorzugt jedoch eine Vielzahl von Zellen enthalten, die die erfindungsgemäßen oder die erfindungsgemäß eingesetzten

- 38 -

Vektorsysteme oder Derivate oder Teile davon enthalten, und die aufgrund der Aufnahme dieser Vektorsysteme, Derivate oder Teile der Vektorsysteme zu einer Synthese von Proteinen befähigt sind, die eine modifizierte Saccharose-Transportaktivität, insbesondere SUT4-Aktivität, bewirken. Die Erfindung ermöglicht also die Bereitstellung von Pflanzen der verschiedensten Arten, Gattungen, Familien, Ordnungen und Klassen, die die vorgenannten Charakteristika aufweisen. Bei den transgenen Pflanzen kann es sich prinzipiell um Pflanzen jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln, d. h. sowohl monocotyle als auch dicotyle Pflanzen, wie Graminae, Piniaceae, Magnoliaceae, Ranunculaceae, Caryophyllaceae, Rosaceae, Asteraceae, Araceae, Liliaceae, Arecaceae und Commelinaceae ebenso wie Gymnospermae, Algen, Moose, Farne oder auch Calli, Pflanzenzellenkulturen etc., sowie Teile, Organe, Gewebe, Ernte- oder Vermehrungsmaterialien davon. Bevorzugt handelt es sich um Nutzpflanzen, insbesondere um stärkesynthetisierende bzw. stärkespeichernde Pflanzen, wie z. B. Weizen, Gerste, Reis, Mais, Topinambur, Zuckerrübe, Zuckerrohr oder Kartoffel. Die Erfindung betrifft aber auch andere Pflanzen wie Tomate, Arabidopsis, Erbse, Raps, Sonnenblume, Tabak, Roggen, Hafer, Maniok, Salat, Spinat, Wein, Apfel, Kaffee, Tee, Banane, Kokos, Palmen, Bohnen, Pinien, Pappel, Eukalyptus etc.. Die Erfindung betrifft ebenfalls Vermehrungsmaterial und Ernteprodukte der erfindungsgemäßen Pflanzen, beispielsweise Blüten, Früchte, Samen, Knollen, Wurzeln, Blätter, Wurzelstöcke, Sämlinge, Stecklinge, etc.

Zur Expression der erfindungsgemäßen oder erfindungsgemäß eingesetzten Nucleinsäuremoleküle in sense- oder antisense-Orientierung z. B. in pflanzlichen Zellen werden diese mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten. Hierzu zählen insbesondere Promotoren. Generell kommt für die Expression der SUT1-, SUT2 und/oder SUT4-codierenden Nucleotidsequenzen jeder in Pflanzen aktive Promotor in Betracht, z.B. ein Promotor, der konstitutiv exprimiert, oder nur in einem bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung oder zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt. In Bezug auf die Pflanze kann der Promotor homolog oder heterolog sein. Einsetzbare Promotoren sind z. B. der Promotor der 35S RNA des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) und der Ubiquitin-Promotor aus Mais für eine konstitutive Expression, besonders bevorzugt der Patatingen-Promotor B33 (Rocha-Sosa et al., a.a.O.) für eine knollenspezifische Expression in Kartoffeln oder ein Promotor, der eine Expression lediglich in photosynthetisch aktiven Geweben sicherstellt, z. B. der ST-LS1-Promotor (Stockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987)84, 7943-7947, Stockhaus et al., EMBO J. (1989)8, 2445-2451) oder für eine endosperm-spezifische Expression der HMG-Promotor aus Weizen, der USP-Promotor, der Phaseolinpromotor oder Promotoren von Zein-Genen aus Mais. Im Vektor kann zudem eine Terminationssequenz vorhanden sein, die der korrekten Beendigung der Transkription dient sowie der Addition eines Poly-A-Schwanzes an das Transkript, um dieses zu stabilisieren. Derartige Elemente sind in der Literatur beschrieben (Gielen

et al., EMBO J. (1989)8, 23-29) und sind beliebig austauschbar. Weitere Promotoren werden vorstehend beschrieben.

Für die Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen stehen eine große Anzahl von Clonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für E.coli und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC181 usw. Die gewünschte Sequenz kann an einer passenden Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird für die Transformation von z. B. E.coli-Zellen verwendet. Transformierte E.coli-Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet, anschließend geerntet und lysiert. Das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analysemethode zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid DNA werden im allgemeinen Restriktionsanalysen, Gelelektrophoresen und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden eingesetzt. Nach jeder Manipulation kann die Plasmid-DNA gespalten und gewonnene DNA-Fragmente mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden. Jede Plasmid-DNA-Sequenz kann in den gleichen oder anderen Plasmiden cloniert werden. Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der biolistischen Methode sowie weitere

Möglichkeiten. Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden an sich keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Es können einfache Plasmide wie z. B. pUC-Derivate verwendet werden. Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, sollte ein selektierbarer Marker vorhanden sein.

Je nach Einführungsmethode der SUT1-, SUT2- und/oder SUT4-codierenden Nucleotidsequenzen in die Pflanzenzelle können weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z. B. für die Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muss mindestens die rechte Bordersequenz, häufig jedoch die rechte und linke Bordersequenz der Ti- und -Ri-Plasmid-T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden. Werden für die Transformation Agrobakterien verwendet, muss die einzuführende DNA in spezielle Plasmide cloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären Vektor oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Diese enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige vir-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf *Agrobacterium tumefaciens* übertragen werden. Binäre Vektoren können sowohl in *E.coli* als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen Linker oder Polylinker,

welche von der rechten und linken T-DNA Borderregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (Holsters et al., Mol. Gen. Genet. (1978)163, 181-187). Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium soll ein Plasmid, das eine vir-Region trägt, enthalten. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet. Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist beschrieben in EP-A-120 516; Hoekema: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters. B.V., Alblasterdam (1985), Chapter V, Fraley et al., Crit. Rev. Plant. Sci., 4, 1-46 und An et al. EMBO J. (1985)4, 277-287. Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate mit Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes kokultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial z. B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden. Die so erhaltenen Pflanzen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA untersucht werden. Andere Möglichkeiten der Einführung fremder DNA unter Verwendung des biolistischen Verfahrens oder durch Protoplastentransformation sind bekannt (Willmitzer, L., 1993 Transgenic plants, In: Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise (H. J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, eds.), Vol. 2, 627-659, VCH Weinheim New York Basel Cambridge). Alternative Systeme zur Transformation von monocotylen

Pflanzen sind die elektrisch oder chemisch induzierten DNA-Aufnahme in Protoplasten, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Makroinjektion von DNA in Blütenstände, die Mikroinjektion von DNA in Mikrosporen und Pro-Embryonen, die DNA-Aufnahme durch keimende Pollen und die DNA-Aufnahme in Embryonen durch Quellung (Potrykus, *Physiol. Plant* (1990), 269-273). Während die Transformation dicotyler Pflanzen über Ti-Plasmid-Vektorsysteme mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* etabliert ist, weisen neuere Arbeiten darauf hin, dass auch monocotyle Pflanzen der Transformation mittels *Agrobacterium* basierter Vektoren zugänglich sind (Chan et al., *Plant Mol. Biol.* (1993)22, 491-506; Hiei et al., *Plant J.* (1994)6, 271-282; Bytebier et al., *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* (1987)84, 5345-5349; Raineri et al., *Bio/Technology* (1990)8, 33-38; Gould et al., *Plant. Physiol.* (1991)95, 426-434; Mooney et al.; *Plant, Cell Tiss. & Org. Cult.* (1991)25, 209-218; Li et al., *Plant Mol. Biol.* (1992)20, 1037-1048). Einige der genannten Transformationssysteme sind für verschiedene Getreide etabliert worden: die Elektroporation von Geweben, die Transformation von Protoplasten und der DNA-Transfer durch Partikel-Beschuss in regenerierbare Gewebe und Zellen (Jähne et al.; *Euphytica* 85 (1995), 35-44). Die Transformation von Weizen wird in der Literatur beschrieben (Maheshwari et al., *Critical Reviews in Plant Science* (1995)14(2), 149-178) und von Mais in Brettschneider et al. (*Theor. Appl Genet.* (1997)94, 737-748) und Ishida et al. (*Nature Biotechnology* (1996)14, 745-750).

- 44 -

Die Erfindung betrifft auch Identifizierungs- bzw. Screeningverfahren für Modulatoren des Saccharosestoffwechsels, bevorzugt potenzielle Pestizide und Herbizide, wobei SUT4 und/oder SUT2-exprimierende Zellen oder Gewebe, insbesondere erfindungsgemäße Wirtszellen oder Pflanzen, z.B. erfindungsgemäße Hefe- oder Pflanzenzellen in Kontakt mit dem zu untersuchenden potenziellen Modulator, z.B. Pestizid oder Herbizid gebracht und die Wirkung, insbesondere die inhibitorische Wirkung des potenziellen Modulators, z.B. Pestizids oder Herbizids, auf die Aktivität von SUT1, SUT2 und/oder SUT4 quantitativ oder qualitativ nachgewiesen wird. Ebenso kann SUT2 und/oder SUT4 zur Entwicklung von Systemen dienen, die eine verbesserte Mobilisierung von Pestiziden ermöglichen. Durch Durchmusterung chemischer Bibliotheken nach Substanzen, die spezifisch das Wachstum von Hefen blockieren, die niedrig affine Saccharosetransporter wie SUT4 exprimieren, oder die Kombinationen von anderen Saccharosetransportern z.B. SUT4 und SUT2 oder SUT2 und SUT1 oder SUT4 und SUT1 coexprimieren, können Inhibitoren identifiziert werden. Diese Inhibitoren könnten als Herbizide eingesetzt werden oder als Vorstufen von neuen Herbiziden dienen. Auf Basis der Tests können auch potentielle Pestizide identifiziert werden, die über diese Transporter in der Pflanze mobilisiert und so besser zu ihrem Zielort gelangen können. [9]

Die Erfindung umfasst auch die Beeinflussung der Kimeraplasty, d.h. die Beeinflussung der Aktivität der Transporter in der Pflanze durch Verwendung von gemischten Oligonukleotiden, wodurch die Aktivität

der Saccharosetransporter entweder erhöht, erniedrigt oder deren biochemischen Eigenschaften verändert werden. Ein derartiges Verfahren ist in der WO99/07865 beschrieben, die hinsichtlich dieses Verfahrens vollständig in den Offenbarungsgehalt der vorliegenden Lehre mit einbezogen ist und für das im erfindungsgemäßen Kontext Schutz begehrt wird.

Die Erfindung betrifft also auch die Verwendung von SUT2-codierenden Nucleotidsequenzen oder von SUT2 zur Identifizierung von Modulatoren, insbesondere Induktoren, Aktivatoren oder Inhibitoren des Saccharose-Transportes, insbesondere der Sensorik und/oder Regulation des Saccharose-Transportes in einer Pflanze, wobei die Aktivität des von den SUT2-codierenden Nucleotidsequenzen codierten Proteins in Anwesenheit und Abwesenheit eines potenziellen Modulators nachgewiesen wird. Es kann dabei auch vorgesehen sein, nicht die Aktivität von SUT2, sondern eines von SUT2 regulierten Saccharose-Transporters z.B. SUT1 oder SUT4 nachzuweisen.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung von SUT1 codierenden Nucleotidsequenzen, insbesondere der SEQ ID Nr. 22 und/oder von SUT4-codierenden Nucleotidsequenzen und/oder von SUT1 und/oder SUT4 zur Identifizierung von Modulatoren der Saccharose-Transportaktivitäten in einer Pflanze, insbesondere eines Inhibitors der niedrig-affinen, hochkapazitiven Beladung des Phloems mit Saccharose, wobei die Aktivität eines von den SUT4-Nucleotidsequenzen codierten Proteins in Anwesen-

- 46 -

heit und Abwesenheit des potenziellen Modulators nachgewiesen wird.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung der erfindungsgemäßen SUT1-, SUT2- und SUT4-Nucleotidsequenzen zur Identifizierung von homologen Genen in anderen Pflanzen, z.B. aus cDNA- oder genomischen Banken.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung der Gene und der umgebenden Regionen als molekulare Marker für Kreuzungsprogramme. Sowohl SUT2 als auch SUT4 Loci liegen in Regionen von QTL-Loci für hohen Kohlenhydratgehalt und hohen Ertrag bei Kartoffelknollen. Daher sind beide geeignet, um in Züchtungsprogrammen aus Wildformen oder Hochleistungssorten geeignete Chromosomenfragmente einzukreuzen und so Pflanzen mit verbesserten Erträgen zu erzeugen.

Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Das Sequenzprotokoll enthält:

SEQ ID Nr. 1: die codierende DNA-Sequenz des SUT4-Gens aus *Arabidopsis thaliana*.

SEQ ID Nr. 2: die codierende DNA-Sequenz des SUT4-Gens aus *Lycopersicon esculentum*.

SEQ ID Nr. 3: die codierende DNA-Sequenz des SUT2-Gens aus *Arabidopsis thaliana*.

SEQ ID Nr. 4: die codierende DNA-Sequenz des SUT2-Gens aus *Lycopersicon esculentum*.

- 47 -

SEQ ID Nr. 5: die Aminosäuresequenz von SUT4 aus *Arabidopsis thaliana*.

SEQ ID Nr. 6: die Aminosäuresequenz von SUT4 aus *Lycopersicon esculentum*.

SEQ ID Nr. 7: die Aminosäuresequenz von SUT2 aus *Arabidopsis thaliana*.

SEQ ID Nr. 8: die Aminosäuresequenz von SUT2 aus *Lycopersicon esculentum*.

SEQ ID Nr. 9: einen T-DNA-spezifischen Primer.

SEQ ID Nr. 10: einen SUT4-spezifischen Primer.

SEQ ID Nr. 11: einen SUT4-spezifischen Primer.

SEQ ID Nr. 12 bis 15 stellen weitere SUT4-Primer dar.

SEQ ID Nr. 16 und 17 stellen die Aminosäuresequenz von Abschnitten von LeSUT4 dar.

SEQ ID Nr. 18 bis 21 stellen Clonierungsprimer dar.

SEQ ID Nr. 22: die codierende DNA-Sequenz des SUT1-Gens aus *Solanum tuberosum*.

SEQ ID Nr. 23: die Aminosäuresequenz von SUT1 aus *Solanum tuberosum*.

SEQ ID Nr. 24: die den N-terminalen Bereich von SUT2 codierende DNA-Sequenz von SEQ ID Nr. 3 mit den Nucleotiden 1 bis 239.

- 48 -

SEQ ID Nr. 25: die den N-terminalen Bereich von SUT1 codierende DNA-Sequenz von SEQ ID Nr. 22 mit den Nucleotiden 1 bis 149.

SEQ ID Nr. 26: die die Zentralschleife codierende DNA-Sequenz von SEQ ID Nr. 3 mit den Nucleotiden 843 bis 1130.

SEQ ID Nr. 27: die codierende DNA-Sequenz des SUT4-Gens aus *Solanum tuberosum*.

SEQ ID Nr. 28: die Aminosäuresequenz von SUT4 aus *Solanum tuberosum*.

SEQ ID Nr. 29: die codierende DNA-Sequenz des SUT2-Gens aus *Solanum tuberosum*.

SEQ ID Nr. 30: die Aminosäuresequenz von SUT2 aus *Solanum tuberosum*.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele und der dazugehörigen Figuren näher erläutert.

Die Figuren 1 bis 4 zeigen schematisch den Aufbau erfindungsgemäß eingesetzter Genkonstrukte.

Die Figuren 5 und 6 zeigen grafische Darstellungen der Proteinaktivitäten von SUT 4.

Die Figur 7 stellt erfindungsgemäße chimäre SUT2- und SUT1-Genkonstrukte dar.

Beispiel 1

Isolierung von SUT4 cDNA

In der Datenbank (Genbank) wurden bisher nicht charakterisierte Sequenzen identifiziert, die entfernte Homologie zu SUT1 aufwiesen.

Genomische Sequenz: *AtSUT4* AC000132

Eine cDNA wurde von einer Arabidopsis Sämling-Bank mittels PCR amplifiziert (Minet et al., Plant J. (1992) 2, 417-422). Primer auf Basis der genomischen Sequenz (5'-gactctgcagcgagaaatggctacttccg SEQ ID Nr. 12, 5'-taacctgcaggagaatctcatgggagagg SEQ ID Nr. 13) wurden entworfen. Die Primer beinhalten jeweils eine PstI-Restriktionsschnittstelle (unterstrichen) und sind so entworfen, dass die gesamte Codiersequenz von *AtSUT4* amplifiziert wird. Ein Produkt mit der erwarteten Größe von 1566 bp wurde mit PstI geschnitten und in die PstI-Stelle des Vektor pBC SK+(Stratagene) ligiert. *AtSUT4* wurde in die PstI-Stelle von pDR196 subcloniert. Die *AtSUT4*-cDNA in pDR196 wurde in beide Richtungen sequenziert. Ecotyp-Unterschiede zwischen dem SUT4-Gen in Columbia und Landsberg erecta wurden durch die Sequenzierung von *AtSUT4* aus Landsberg erecta verifiziert.

Eine Tomaten-(*Lycopersicon esculentum* cv. UC82b) cDNA-Bank (Blüten) wurde mit einem 300 bp EcoRIBglII-Fragment des genomischen Tabakclons *NtSUT3* (Lemoine et al., FEBS Lett. (1999) 454, 325-330) un-

- 50 -

ter reduzierter Stringenz durchmustert. Drei unabhängige von LeSUT1 verschiedene Clone wurden isoliert und als LeSUT4 bezeichnet. Mit Primern der LeSUT4-Sequenz wurde die orthologe Sequenz durch RT-PCR aus Kartoffel isoliert und als StSUT4 bezeichnet. StSUT4 wurde als PstI/NotI-Fragment in pBC SK-(Stratagene) cloniert und als XhoI/SacII-Fragment in den Hefeexpressionsvektor pDR195 subcloniert, welcher einen URA3-Marker, PMA1-Promotor und ADH1-Terminator (Rentsch et al., FEBS Lett. (1995) 370, 264-268) aufweist. Für das Amplifizieren von StSUT4 (ORF, = cDNA sequenz) wurden verwendet: **5'-SUT4-PstI** 5'-GAGACTGCAGATGCCGGAGATAGAAAGGC-3' (SEQ ID Nr. 14) **5'-SUT4-NotI** 5'-TATGACAGCGGCCGCTCATGCAAAGATCTTGGG-3' (SEQ ID Nr. 15)

Beispiel 2

Isolierung von SUT2 cDNA

In der Datenbank (Genbank) wurden bisher nicht charakterisierte Sequenzen identifiziert, die entfernte Homologie zu SUT1 aufwiesen.

Genomische Sequenz: AtSUT2 AC004138

Es wurden auf der Basis von detaillierten Sequenzvergleichen andere bekannte homologe Primersequenzen identifiziert, die eine Klonierung der potenziellen cDNA Sequenz über RT-PCR aus Blatt mRNA ermöglichen könnten.

Primer auf Basis der genomischen Sequenz (5'-TACGAGAATTCGATCTGTGTGTTGAGGACG, SEQ ID Nr. 20, 5'-AGAGGCTCGAGTGGTCAAAAAGAATCG, SEQ ID Nr. 21) wurden entworfen. Die Primer enthalten eine EcoRI- bzw. eine XhoI Restriktionsschnittstelle (unterstrichen)

und sind so entworfen, dass die gesamte Codiersequenz von AtSUT2 amplifiziert wird. Ein Produkt mit der erwarteten Größe von 1785 bp wurde mit EcoRI und XhoI geschnitten und gerichtet in den Vektor pDR196 ligiert.

Beispiel 3

Funktionsanalyse des SUT4

Der Hefestamm SUSY7/ura3 ist eine modifizierte Version des SUSY7 (Riesmeier et al., EMBO J. (1992) 11, 4705-4713), welcher eine Deletion eines Teils des URA3-Gen enthält und dadurch eine Selektion für Uracil-auxotrophie ermöglicht. Für die Analyse von Hefewachstum auf Saccharose-Medium wurden Medien verwendet, die 1,7 g/l Hefe-Stickstoffbase ohne Aminosäuren (Difco), 2% Saccharose, 20 mg/l Tryptophan und 1,5% Agarose, pH 5,0 enthielten.

Für die Saccharoseaufnahme-Tests wurde Hefe in flüssigem Minimalmedium, welches Glucose enthielt, bis zu einer OD₆₂₃ von $\approx 0,8$ kultiviert. Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt, in 25 mM Natriumphosphatpuffer gewaschen (pH 5,5) und in selbigem Puffer zu einer OD₆₂₃ von 20 suspendiert. Die Aufnahme-Tests wurden initiiert durch das Hinzufügen von Glucose bis zu einer Endkonzentration von 10 mM zu den Hefezellen eine Minute vor dem Hinzufügen von ¹⁴C-Saccharose. Nach Inkubation bei 30° C unter Rühren wurden Zellen durch Vakuumfiltration auf Glasfaserfiltern gesammelt (1 - 5 Minuten), zweimal mit 4 ml 10 mM Saccharose (um den Gefrierpunkt) gewaschen und Radioaktivität durch einen Flüssigszintillationszähler festgestellt. Die AtSUT4 Ex-

pression erlaubte Hefe-Wachstum auf Saccharose. AtSUT4 und StSUT4 erwiesen sich als funktionale Saccharosetransporter. Der zeitliche Verlauf der Aufnahme von ^{14}C -Saccharose der AtSUT4 oder StSUT4 exprimierenden Hefe ist in Figur 5A gezeigt. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zu den Vektorkontrollen.

Daten für die kinetische Analyse wurden für SUT4 aus einer nichtlinearen Regression der Aufnahmemessungen mit der Michaelis-Menten Gleichung erhalten. Der K_m wurde als Durchschnitt von acht Bestimmungen unter Verwendung von drei unabhängigen Transformanten $\pm$ Standardabweichung dargestellt. Der ermittelte K_m -Wert für Saccharose beträgt für SUT4 aus *Arabidopsis* $11,6 \pm 0,6$ mM (bei pH 5.5) und $5,9 \pm 0,8$ mM (bei pH 4.0). Für SUT4 aus *Solanum tuberosum* ergab sich ein K_m -Wert von $6,0 \pm 1,2$ mM (pH 4.0) (vergleiche Figur 5B).

Die Stimulation der Aufnahme von ^{14}C -Saccharose über SUT4 durch Glucose und die Inhibition durch einen Elektronen-Transportinhibitor (Antimycin A und den Protonophoren CCCP ist in Figur 5C gezeigt). Figur 6 stellt das pH-Optimum von SUT4-vermitteltem Saccharose-Transport dar.

Beispiel 4

Herstellung einer SUT4-Insertionsmutanten (*Arabidopsis thaliana*)

Samen von 12.800 T-DNA-mutagenisierten *Arabidopsis*-Pflanzen (entsprechen 19.200 Insertionsvorgängen) wurden von Dupont Co. und von *Arabidopsis* Biologi-

cal Resource Center (ABRC), Ohio State Universität, erhalten. Die Pflanzen wurden in Gruppen von je 100 untersucht. Die Pflanzen wurden in steriler Kultur wachsen gelassen und genomische DNA isoliert. Die DNA aus den 140 Gruppen von je 100 Pflanzen wurde in 14 Übergruppen (superpool) zusammengefasst und nach der Methode von Krysan et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 93, 8145-8150) gescreent, wobei genspezifische und T-DNA-spezifische Primer verwendet wurden. Eine PCR wurde durchgeführt mit der Superpool-DNA als Template, einem T-DNA spezifischen Primer (LB, linke Borderregion SEQ ID Nr. 9) und einem genspezifischen Primer (AtSUT4r2 SEQ ID Nr. 10). Die PCR-Produkte wurden durch Agarosegelelektrophorese getrennt und auf eine geladene Nylonmembran überführt. Die Membran wurde mit einem PCR-Produkt von 2,46 kb Länge hybridisiert, hergestellt aus WS (Wassilewskija) genomischer DNA als Template und den Primern AtSUT4r2 (siehe oben) und AtSUT4f2 (ATGGCTACTTCCGATCAAGATCGCCGTC SEQ ID Nr. 11). Diese Sonde wurde mit ³²P-CTP markiert.

Ein Superpool wurde durch Hybridisierung der markierten Sonde mit dem Blot identifiziert. DNA aus den Pools von 100 Pflanzen, die den Superpool bilden, wurden anschließend auf gleiche Weise durchmustert: PCR wurde durchgeführt mit DNA aus Pools von 100 als Template und AtSUT4r2 und LB als Primer, DNA-Blot-Hybridisierung wurde mit der AtSUT4 genomischen Sonde (2,46 kb) durchgeführt zur Detektion von amplifizierten Produkten.

Positive Hybridisierung wurde bei Pool CS2165 beobachtet, welcher 100 T-DNA mutagenisierte Linien

umfasst. Einzelne Pflanzen von CS2165 wurden kultiviert und genomische DNA präpariert. Die DNA einzelner Pflanzen wurde wie dargestellt durchmustert. PCR wurde durchgeführt mit DNA der einzelnen Pflanzen als Template und AtSUT4r2 und LB als Primer. PCR-Produkte wurden auf Agarosegel durch Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Das PCR-Produkt wurde mit AtSUT4r2 und LB als Sequenzprimer sequenziert. Eine mit dem AtSUT4-Gen identische Sequenz deutet auf eine T-DNA-Insertion in dem AtSUT4-Gen hin.

In der Gruppe CS2615 (Ohio State University, ABRC) wurde eine Pflanze erhalten, die ein positives Ergebnis sowohl mit einem T-DNA-spezifischen Primer (LB 5'-GATGCACTCGAAATCAGCCAATTTAGAC) (SEQ ID Nr. 9) als auch mit einem SUT4-spezifischen Primer (AtSUT4r2 5'-TCATGGGAGAGGGATGGGCTTCTGAATC) (SEQ ID Nr. 10) ergab. Einzelne Pflanzen wurden isoliert und die Insertionsstelle der T-DNA sequenziert, wobei gezeigt werden konnte, dass die linke Bordersequenz der T-DNA etwa 480 Basenpaare stromaufwärts des ATG des SUT4-Gens vorhanden war. Die Mutante wurde zweimal mit WS (Wassilewskija) zurückgekreuzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Kanamycin-Resistenz in einem Verhältnis 2,9:1 (427:147) segregierte, was die Anwesenheit eines einzelnen markierten Locus anzeigt. Homozygote Pflanzen wurden erhalten. Diese enthielten signifikant mehr Stärke als der WS-Wildtyp, was durch KI (Kaliumjodid)-Färbung nachgewiesen werden konnte. Zudem zeigten die Pflanzen ein stärkeres Sprosswachstum unter Licht. Beide Ergebnisse zeigen deutlich, dass AtSUT4 beim Saccharose-Export aus Source-Organen,

nämlich Blättern, eine bedeutende Rolle spielt. RT-PCR zeigt, dass die mRNA von SUT4 in der Mutante vorhanden ist und dass die Mutante demgemäß keine "Knockout"-Pflanze ist.

Beispiel 5

Isolation und RNase-Schutz-Analyse

RNA wurde von verschiedenen Organen einer im Gewächshaus kultivierten Tomate (*L. esculentum*, cv. Moneymaker) nach der Methode von Schwacke (Schwacke et al., Plant Cell (1999) 11, 377-392) isoliert. Reverse Transcription wurde durchgeführt mit dem MAXIscript™ SP6/T7 in vitro Transcription Kit (Ambion), unter Verwendung von α -³²P UTP. Ein 600 bp PCR-Produkt wurde von pSport erhalten, welches das 340 bp LeSUT4 Fragment enthielt. Dies wurde als Template verwendet. Die Sonde wurde nicht weiter aufgereinigt und 300.000 CPM wurden pro Probe hybridisiert. Hybridisierung wurde über Nacht mit 20 µg RNA bei 45°C durchgeführt. Nach RNA-Verdau wurde die geschützte RNA auf einem 5% Polyacrylamidgel (13 x 15 cm) bei 150 mV aufgetrennt. Die Gele wurden getrocknet und Röntgenfilmen ausgesetzt.

Sowohl bei einer RNA-Blot-Analyse als auch bei der RNA-Schutz-Analyse wurde die stärkste Expression von SUT4 in Sink-Blättern, Stiel, Cotyledonen und unreifen Früchten gefunden. In Source-Blättern konnte nur geringe Expression nachgewiesen werden.

Beispiel 6**Herstellung von anti-SUT4 Antiseren und Immunolokalisation**

Kaninchen wurde immunisiert mit synthetischen mit KLH gekoppelten Peptiden, entsprechend entweder dem N-Terminus (MPEIERHRTRHNRPAIREPVKPR SEQ ID Nr. 16) oder dem zentralen Loop (GSSHTGEEIDESSHGQEEAFLW SEQ ID Nr. 17) von LeSUT4. Eine Affinitätsreinigung der Antisera wurde wie vorher beschrieben (Kühn et al., (1997) a.a.O.) mittels synthetischer Peptide verbunden mit CNBr-aktivierten Sepharose-4B-Säulen (Pharmacia) durchgeführt. Präimmunserum wurde durch die gleiche Methode gereinigt, mit Ausnahme, dass Protein A Sepharose (BioRad) anstatt der Peptidaffinitätschromatographie verwendet wurde.

Fluoreszenz-Immunodetektion von SUT4 in Kartoffel und Tomate wurde durchgeführt wie beschrieben (Stadler et al., Plant Cell (1995) 7, 1545-1554) mit den nachstehend beschriebenen Modifikationen. Von Hand geschnittene Abschnitte (1 mm) aus Tomaten- oder Kartoffelstiel wurden über Nacht im Vakuum in Mops-Puffer (50 mM Mops/NaOH pH 6,9, 5 mM EGTA, 2 mM MgCl₂) beinhaltend 0,1% Glutaraldehyd und 6% Formaldehyd fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit Mops-Puffer auf Eis wurden die Fragmente dehydriert durch Inkubation in einer Ethanolserie, gefolgt von zwei Inkubationen in 96% Ethanol. Nach Inkubation über Nacht in 1:1 Ethanol: Methylacrylatgemisch (75% [v/v] Butylmethylacrylat, 25% [v/v] Methylmethacrylat, 0,5% Benzoinethylether, 10 mM DTT) wurde das Material in 100% Methylacrylatgemisch eingebettet. Die Polymerisation fand über

- 57 -

Nacht unter UV-Licht (365 nm) bei 4° C statt. Halbdünne Sektionen (1 µm) wurden auf vorgewärmte Histobond-Objektträger (Cameron) aufgebracht und bei 50° C getrocknet.

Um das Methylacrylat von den Sektionen zu entfernen, wurden die Objektträger für 30 Sekunden in Aceton inkubiert, rehydriert über eine Ethanolserie und blockiert für 1 Stunde mit 2% BSA in PBS (100 mM Natriumphosphat, pH 7,5, 100 mM NaCl). Nach der Inkubation über Nacht mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen LeSUT4 wurden die Objektträger zweimal in PBS-T (PBS mit 0,1% Tween) und einmal mit PBS, gefolgt von einer einstündigen Inkubation mit Antikaninchen-Konjugat IgG-FITC (Fluoresceiniso-thio-cyanat) gewaschen. Nach drei Waschschritten mit PBS-T, PBS und destilliertem Wasser wurden Aufnahmen gemacht mit einem Fluoreszenzphasenmikroskop (Zeiss, Axiophot) und einem Erregerlicht von 450-490 nm.

Fluoreszenzsignale konnten nur in Siebelementen nachgewiesen werden (Tomate und Kartoffel)

Beispiel 7

Herstellung von transgenen Pflanzen

Das AtSUT2 Überexpressionskonstrukt (oAtSUT2_{35S})

AtSUT2 cDNA wurde mittels PCR amplifiziert - das Produkt war 1.785 bp lang entsprechend dem erfindungsgemäßen Codierungsbereich von ATG (Position 1) bis TGA (Position 1785). Das Fragment wurde in Sense-Orientierung cloniert in eine 35S-Promotor-

- 58 -

Expressionskassette (pBinAr35S), welche als EcoRI/HindIII-Fragment von pBinAr (Höfgen und Willmitzer, Plant Sc.(1990) 66, 221-230) isoliert wurde. Dieses Konstrukt wurde mit HindIII und EcoRI geschnitten und in das HindIII/EcoRI-geschnittene pGTPV-bar cloniert (Becker et al., a.a.O. Plant Mol. Biol. (1992) 20, 1195-1197). Pflanzen wurden transformiert.

Das AtSUT2 Antisensekonstrukt (α AtSUT2_{35S})

AtSUT2 cDNA (ATTS5034EST Zugangsnummer) wurde mit SacI und BamHI geschnitten und in Antisense-Orientierung in die pBinAr35S-Expressionskassette cloniert. Dieses Konstrukt wurde mit HindIII und EcoRI geschnitten und in das HindIII/EcoRI-geschnittene pGPTV-bar cloniert (Becker et al., a.a.O.). Pflanzen wurden transformiert.

Das AtSUT4 Überexpressionskonstrukt (α AtSUT4_{AtSUC2})

AtSUT4 cDNA wurde amplifiziert. Das 1.533 bp-Fragment beginnt mittels PCR bei Position 1 der erfindungsgemäßen AtSUT4cDNA-Sequenz und endet bei TAG Position 1533. Der SUC2-Promotor wurde aus Arabidopsis (Columbia-Ecotyp) genomischer DNA mittels der folgenden Primer getrennt: (reverse 5'-ATGGCTGACCAGATTTGAC ; SEQ ID Nr. 18 und forward 5'-GTTTCATATTAATTTTCAC; SEQ ID Nr. 19). Das 1,533 kb-Fragment wurde in Sense-Orientierung hinter dem AtSUC2-Promotor (X79702) cloniert. Dieses Konstrukt wurde mit HindIII und EcoRI geschnitten und in das HindIII/EcoRI-geschnittene pGPTV-bar cloniert (Be-

cker et al., a.a.O.). Pflanzen wurden transformiert.

LeSUT4 Antisense-Konstrukt (α LeSUT4_{35S})

Die LeSUT4 cDNA wurde mit BamHI geschnitten, wobei ein 1,3 kb-Fragment erhalten wurde, welches geglättet und in die SmaI-Schnittstelle von pBinAR cloniert wurde (Bevan, Nucleic Acids Research (1983) 12, 8711-8721).

Die Figuren 1 bis 4 stellen die vorgenannten Konstrukte dar.

Beispiel 8

8.1. Herstellung eines chimären Proteins zwischen AtSUT2 und StSUT1

Das offene Leseraster von AtSUT2 wurde mittels RT-PCR aus *Arabidopsis thaliana* (Columbia Ecotyp) Blättern isoliert und in den Hefeexpressionsvektor pDR196 (Barker et al., (2000) Plant Cell 12: 1153-1164) cloniert. Das offene Leseraster von StSUT1 wurde von der StSUT1 cDNA in pDR195 (Riesmeier et al., (1993) a.a.O.) amplifiziert, wobei Primer mit den Restriktionsschnittstellen für SmaI und XhoI verwendet wurden. Das offene Leseraster wurde in den Hefeexpressionsvektor pDR196 ligiert.

Es wurden chimäre Konstrukte hergestellt, in denen der N-terminus von AtSUT2, also der erfindungsgemäße N-terminale Bereich von SUT2 (codiert von SEQ ID Nr. 24) mit der entsprechenden N-terminalen Domäne von StSUT1 (codiert von SEQ ID Nr. 25), also der

- 60 -

erfindungsgemäße N-terminale Bereich von SUT1 ausgetauscht wurden und umgekehrt, wobei mittels PCR Restriktionsschnittstellen innerhalb einer konservierten Region der ersten Transmembrandomäne von AtSUT2 und StSUT1 hergestellt wurden. Anschließend wurden PCR-Fragmente des N-terminalen Bereichs und des Restes der Sequenz in den Hefeexpressionsvektor pDR196 cloniert, wobei die Schnittstellen SmaI und PstI für die N-terminalen Bereiche und PstI (SdaI für AtSUT2) und XhoI für den restlichen Bereich des offenen Leserasters verwendet wurden. Diese chimären Konstrukte werden im Folgenden als AtSUT2/StSUT1-N und StSUT1/AtSUT2-N bezeichnet und sind in Figur 7 dargestellt.

Das Konstrukt StSUT1/AtSUT2-N weist die Nucleotide 1 bis 239 von SEQ ID Nr. 3 fusioniert zu den Nucleotiden 150 bis 1548 von StSUT1, dargestellt in SEQ ID Nr. 22 auf, wobei das Konstrukt aufgrund clonierungstechnischer Gegebenheiten einen Nucleotid austausch von t zu c aufweist. Im Folgenden ist der Fusionsbereich des Konstruktes sequenzmäßig dargestellt, wobei die kleinen Buchstaben die Sequenzen von SUT2 und die großen Buchstaben die Sequenzen von SUT1 sind (obere Zeile: ohne Austausch, untere Zeile: mit Austausch):

...tgggcattgca/GCTCTCTT...

...tgggcactgca/GCTCTCTT...

AtSUT2/StSUT1-N weist die Nucleotide 1 bis 149 von StSUT1, dargestellt in SEQ ID Nr. 22, fusioniert zu den Nucleotiden 240 bis 1785 von AtSUT2 dargestellt

- 61 -

in SEQ ID Nr. 3 auf. Aufgrund clonierungstechnischer Gegebenheiten weist das Konstrukt gegenüber der Wildtypsequenz 3 Nucleotidaustausche auf. Im Folgenden ist der Fusionsbereich dargestellt, in der oberen Zeile das theoretisch erhältliche Konstrukt und in der unteren Zeile der tatsächlich hergestellte Fusionsbereich. Die Großbuchstaben beziehen sich auf Sequenzen von SUT1 und die Kleinbuchstaben auf Sequenzen von SUT2:

```
...TGGGCTCTTCA/actttct  
...TGGGCTCTGCA/ggtttct
```

Es wurden weiterhin chimäre Konstrukte hergestellt, in denen der zentrale cytoplasmatische Bereich, insbesondere Loop, von AtSUT2, der in SEQ ID# 26 dargestellt ist, mit dem kleineren cytoplasmatischen Bereich, insbesondere Loop, von StSUT1 ausgetauscht wurden und umgekehrt. Dabei wurden Restriktionsschnittstellen mittels PCR innerhalb konservierter Bereiche der transmembranen Regionen VI und VII verwendet. Die N-terminale Hälfte, der cytoplasmatische Loop und die C-terminale Hälfte des offenen Leserasters wurden mittels PCR unter Verwendung der Pfu-Polymerase (Stratagene) amplifiziert und in den Hefeexpressionsvektor cloniert durch Ligieren der ersten drei Fragmente unter Verwendung von Sac I und BclI/BglII für AtSUT2 mit dem StSUT1-Loop und SacI und BamHI/BglII für StSUT1 mit dem AtSUT2-Loop. Die chimäre DNA wurde dann in den Hefeexpressionsvektor pDR196 unter Verwendung von SmaI und XhoI ligiert. Diese chimären Konstrukte werden weiterhin als AtSUT2/StSUT1-Loop und

- 62 -

StSUT1/AtSUT2-Loop bezeichnet und in Figur 7 dargestellt.

Das Konstrukt AtSUT2/StSUT1-Loop weist die Nucleotide 1 bis 842 von AtSUT2 (SEQ ID Nr. 3), 750 bis 893 von StSUT1 (SEQ ID Nr. 22) und Nucleotide 1131 bis 1785 von AtSUT2 (SEQ ID Nr. 3). Die im Folgenden verwendete Darstellung in Groß- und Kleinbuchstaben entspricht der vorgenannten Verwendung. Ebenso stellt die obere Linie jeweils die Sequenz des theoretisch erhältlichen Konstruktes und die jeweilige untere Linie die tatsächlich aufgrund clonierungstechnischer Gegebenheiten erzielte Sequenz des Konstruktes dar.

1. Fusionsstelle:

```
...tgctaaagagat/CCCGGAGA...  
...tgctaaagagct/CCCGGAGA...
```

2. Fusionsstelle:

```
...GTTTGAAGT/gttatcctgg  
...GTTTGAAGT/gatctcctgg
```

Das Konstrukt StSUT1/AtSUT2-Loop weist die Nucleotide 1 bis 749 von StSUT1 (SEQ ID Nr. 22), Nucleotide 843 bis 1130 von AtSUT2 (SEQ ID Nr. 3) und Nucleotide 894 bis 1548 von StSUT1 (SEQ ID Nr. 22) auf.

1. Fusionsstelle:

```
...AACGAGCT/tcctttta...  
...AACGAGCT/ccctttta...
```

2. Fusionsstelle:

...ctcttacatg/GATCGCGT...

...ctcttacatg/GATCTCGT...

8.2. Funktionale Analyse von AtSUT2 und chimärer Proteine

Für Saccharoseaufnahmetests wurde der Hefestamm SEY6210 (Banakaitis (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83, 9075 - 9070) verwendet, der die entsprechenden cDNAs im Expressionsvektor pDR196 aufwies. Die Aufnahme von 14-C-Saccharose erfolgte wie beschrieben (Weise et al., (2000) Plant Cell 12: 1345-1355). Expressionsanalyse der Proteine in Hefe ergab vergleichbare Mengen für alle untersuchten Proteine.

Es konnte gezeigt werden, dass die Saccharoseaufnahme durch Hefezellen, die AtSUT2 exprimieren, in den ersten fünf Minuten des Tests linear war. In dieser Zeit akkumulierten in 10^8 Zellen 0,1 nmol Saccharose. Die Saccharoseaufnahme durch AtSUT2 war signifikant ($p < 0,05$) höher als bei Hefezellen, die nur den leeren Vektor pDR196 exprimierten. Im Gegensatz dazu war die Transportrate bei StSUT1 exprimierenden Zellen 400-fach höher als bei AtSUT2-exprimierenden Zellen. Kinetische Studien, offenbarten eine sehr geringe Affinität von AtSUT2 für Saccharose. Unter Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung und einer nicht-linearen Regressionsanalyse wurde ein K_M -Wert von $11,7 \pm 1,2$ mM (V_{max}

- 64 -

= $1,5 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} 10^8 \text{ Zellen}^{-1}$) für AtSUT2 bei einem pH-Wert von 4 bestimmt. Im Gegensatz dazu zeigte StSUT1 einen 10-fach niedrigeren K_M -Wert für Saccharose bei 1,7 mM ($V_{\text{max.}} = 210,2 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} 10^8 \text{ Zellen}^{-1}$).

Die Saccharose-Aufnahme durch AtSUT2 war pH-abhängig, wobei die höchsten Aufnahmeraten bei einem pH-Wert von 4,0 gemessen wurden. Die Saccharose-Aufnahme fiel bei alkalischen pH-Werten stark ab und bei einem pH-Wert von 6 konnte keine Saccharose-Aufnahme mehr gemessen werden. Zur Bestimmung der Substratspezifität vom AtSUT2 wurde die Saccharose-Aufnahme (1 mM Saccharose) mit anderen Zuckern und Zuckeralkoholen kompetitiv gemessen. Von den getesteten Substraten (Saccharose, Maltose, Isomaltulose, Glucomannitol, Glucosorbitol, Raffinose, Galactose, Lactose, Mannitol, Sorbitol, Glucose) kompetierte nur Saccharose und zu einem geringeren Ausmaß Maltose signifikant mit ^{14}C -Saccharose. Der Saccharose-Transport durch AtSUT2 konnte durch CCCP und durch den Inhibitor der mitochondrialen ATP-Bildung, Antimycin A, inhibiert werden. Diese Daten sprechen für einen Protonen-gekoppelten Transportmechanismus von AtSUT2.

8.5. Saccharoseaufnahme-Kinetiken der Saccharose-Aufnahme chimärer Proteine

Die Ergebnisse für AtSUT2, StSUT1, und die chimären Proteine sind in der Tabelle dargestellt:

Tabelle:

K_M -Werte für Saccharose der Saccarotransporter StSUT1 und AtSUT2 sowie chimärer Proteine, in denen die N-terminalen Bereiche oder zentralen cytoplasmatischen Loops zwischen den beiden Transportern ausgetauscht wurden. Die Werte sind als Mittelwert $\pm$ Standardfehler bestimmt aus wenigstens drei unterschiedlichen Messungen angegeben. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) an.

Transporter	K_M (mmol L ⁻¹)	V_{max} (nmol Saccharose min ⁻¹ 10 ⁸ Zellen ⁻¹)	N-Terminus	Zentraler Loop	Membrandurchgang
AtSUT2	11.7 $\pm$ 1.2 ^a	1.5 $\pm$ 0.1	AtSUT2	AtSUT2	AtSUT2
AtSUT2/StSUT1-loop	6.7 $\pm$ 2.0 ^{bc}	0.4 $\pm$ 0.1	AtSUT2	StSUT1	AtSUT2
AtSUT2/StSUT1-N	3.4 $\pm$ 1.7 ^c	0.3 $\pm$ 0.05	StSUT1	AtSUT2	AtSUT2
StSUT1/AtSUT2-N	8.1 $\pm$ 1.4 ^b	72.9 $\pm$ 4.9	AtSUT2	StSUT1	StSUT1
StSUT1/AtSUT2-loop	1.4 $\pm$ 0.3 ^c	5.5 $\pm$ 0.3	StSUT1	AtSUT2	StSUT1
StSUT1	1.7 $\pm$ 0.2 ^c	210.2 $\pm$ 5.7	StSUT1	StSUT1	StSUT1

Das von dem chimären Konstrukt AtSUT2/StSUT1-N codierte chimäre Protein zeigt einen signifikant geringeren K_M -Wert für Saccharose von $3,4 \pm 1,6$ mM ($V_{\max.} = 0,3 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} 10^8 \text{ Zellen}^{-1}$) verglichen mit AtSUT2. Im Vergleich dazu zeigte das von dem chimären Konstrukt StSUT1/AtSUT2-N codierte chimäre Protein einen signifikant höheren K_M -Wert für Saccharose von $8,08 \pm 1,4$ mM ($V_{\max.} = 72,9 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} 10^8 \text{ Zellen}^{-1}$) verglichen mit StSUT1. AtSUT2/StSUT1-Loop wies einen höheren K_M -Wert ($6,75 \text{ mM} \pm 1,9$) ($V_{\max.} = 0,4 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} 10^8 \text{ Zellen}^{-1}$) für Saccharose auf, während StSUT1/AtSUT2-Loop einen niedrigen K_M -Wert ($1,4 \text{ mM} \pm 0,3$) ($V_{\max.} = 5,5 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} 10^8 \text{ Zellen}^{-1}$) für Saccharose aufwies.

8.6. Bedeutung der N-Termini von Saccharose-Transportern

Die vorstehend beschriebenen Expressions-Experimente der chimären Proteine in Hefe erlauben folgende Rückschlüsse. Der Ersatz des N-Terminus des hoch-affinen Transporters StSUT1 durch den des niedrig-affinen AtSUT2 führte zu einer Erhöhung des K_M -Wertes von 1,7 mM auf 8,1 mM ($p < 0,05$). Der StSUT1 N-Terminus verlieh hohe Affinität an AtSUT2, was sich an einem von 11,7 mM auf 3,4 mM verringerten K_M -Wert ablesen lässt ($p < 0,05$). Strukturelle Unterschiede im N-Terminus zwischen StSUT1 und AtSUT2 scheinen daher einen Großteil der Substrataffinitätsunterschiede zu bewirken. Wahrscheinlich, ohne durch die Theorie gebunden zu sein, beeinflusst der N-Terminus der Saccharose-Transporter die Affinität zur Saccharose durch intramolekulare Interaktionen mit anderen cytosolischen Domänen o-

- 67 -

der durch Kontrolle der Position des ersten Transmembrandurchgangs.

Ansprüche

1. Verfahren zur Modifizierung des Saccharid-Fluxes und/oder der Saccharid-Konzentration in Geweben einer Pflanze, wobei die Aktivität eines Saccharid-Transporters mit hoher Transportkapazität für das Saccharid und niedriger Affinität zu dem Saccharid modifiziert wird, indem mindestens eine Pflanzenzelle mit mindestens einem Vektor transformiert und daraus eine Pflanze regeneriert und erhalten wird, in deren Gewebe ein modifizierter Saccharid-Flux und/oder eine modifizierte Saccharid-Konzentration vorhanden ist und wobei der Vektor eine Nucleotidsequenz aufweist, deren Expression eine Modifizierung der Transportaktivität des Saccharid-Transporters bewirkt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Vektor SUT4-codierende Nucleotidsequenzen, Teile davon oder eine komplementäre Sequenz davon enthält.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Vektor SUT2-codierende Nucleotidsequenzen, Teile davon oder eine komplementäre Sequenz davon enthält.

4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, wobei der Vektor SUT1-codierende Nucleotidsequenzen, Teile davon oder eine komplementäre Sequenz davon enthält.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die codierenden Nucleotidsequenzen cDNA- oder genomische DNA-Sequenzen sind.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Pflanzenzelle mit mindestens einem, eine blattspezifische Überexpression der codierenden Nucleotidsequenz gewährleistenden Vektor transformiert wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Pflanzenzelle mit mindestens einem, eine spezifische Überexpression der codierenden Nucleotidsequenz in Schließzellen gewährleistenden Vektor transformiert wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Pflanzenzelle mit mindestens einem, eine spezifische Expression oder Mutagenese der codierenden Nucleotidsequenzen in Schließzellen gewährleistenden Vektor transformiert und durch Co-suppression, Mutagenese, RNA-Doppelstrang-Inhibierung oder Antisense-Expression eine reduzierte Expression mindestens einer endogen vorhandenen SUT1-, SUT2- und/oder SUT4-codierenden Nucleotidsequenz erreicht wird.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Pflanzenzelle mit mindestens einem, eine spezifische Überexpression der codierenden Nucleotidsequenzen in Sink-Gewebe und/oder Parenchym gewährleistenden Vektor transformiert wird.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Pflanzenzelle mit mindestens einem, eine spezifische Expression oder Mutagenese der codierenden Nucleotidsequenzen in sink-Zellen gewährleistenden Vektor transformiert und durch Co-

- 70 -

suppression, Mutagenese, RNA-Doppelstrang-Inhibierung oder Antisense-Expression eine reduzierte Expression mindestens einer endogen vorhandenen SUT1-, SUT2- und/oder SUT4-codierenden Nucleotidsequenz erreicht wird.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Pflanzenzelle mit mindestens einem, eine spezifische Expression oder Mutagenese der codierenden Nucleotidsequenzen in Blättern gewährleistenden Vektor transformiert und durch Cosuppression, Mutagenese, RNA-Doppelstrang-Inhibierung oder Antisense-Expression eine reduzierte Expression mindestens einer endogen vorhandenen SUT1-, SUT2- und/oder SUT4-codierenden Nucleotidsequenz erreicht wird.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Pflanzenzelle mit mindestens einem, eine Samen-spezifische Überexpression der codierenden Nucleotidsequenzen gewährleistenden Vektor transformiert wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Pflanzenzelle mit mindestens einem, eine spezifische Überexpression der codierenden Nucleotidsequenzen in Blatt-Mesophyll und/oder Blattepidermis gewährleistenden Vektor transformiert wird.

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die codierenden Nucleotidsequenzen unter der operativen Kontrolle mindestens eines regulatorischen Elementes stehen, das die Expression einer

- 71 -

RNA in pro- und/oder eukaryotischen Zellen gewährleistet.

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei die codierenden Nucleotidsequenzen in Sense- oder Antisense-Orientierung unter der operativen Kontrolle des mindestens einen regulatorischen Elementes stehen.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei das mindestens eine regulatorische Element ein Promotor ist.

17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei der Promotor der GAS, SUC2, SUT1, CaMV35S, rolC, enhanced PMA4, KAT1, StLS1/L700, PFP, patatin-B33, AAP1 oder Vicilin-Promotor ist.

18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Saccharid Saccharose ist.

19. Nucleinsäuremolekül, codierend einen Saccharid-Transporter mit niedriger Saccharid-Affinität und hoher Transportkapazität für das Saccharid, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- a) Nucleinsäuremolekülen, die die unter SEQ ID Nr. 1, 2 oder 27 dargestellte Nucleotidsequenz umfassen, eines Teils oder eines komplementären Strangs davon,
- b) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein mit der unter SEQ ID Nr. 5, 6 oder 28 dargestellten Aminosäuresequenz codieren und

- 72 -

- c) Nucleinsäuremolekülen, die mit einer der unter a) und b) genannten Nucleinsäuremolekülen hybridisieren.

20. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 19, wobei der Saccharid-Transporter ein Saccharose-Transporter, insbesondere SUT4, ist.

21. Nucleinsäuremolekül, codierend einen Regulator und/oder Sensor des Saccharid-Transports, insbesondere Saccharose-Transports in Pflanzen oder einem Teil davon, insbesondere SUT2, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- a) Nucleinsäuremolekülen, die die unter SEQ ID Nr. 3, 4, 24, 26 oder 29 dargestellte Nucleotidsequenz umfassen, eines Teils oder eines komplementären Strangs davon,
- b) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein mit der unter SEQ ID Nr. 7, 8 oder 30 dargestellten Aminosäuresequenz codieren und
- c) Nucleinsäuremolekülen, die mit einer der unter a) und b) genannten Nucleinsäuremolekülen hybridisieren.

22. Nucleinsäuremolekül codierend wenigstens den N-terminalen Bereich von SUT1, dargestellt in SEQ ID Nr. 22 und 25.

23. Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 18 bis 22, wobei das Molekül ein DNA- oder RNA-Molekül ist.

24. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 23, wobei das DNA-Molekül eine cDNA oder eine genomische DNA ist.

25. Nucleinsäuremolekül, das ein chimäres Protein codiert, wobei der 5'-terminale Bereich der codierenden Region des Nucleinsäuremoleküls den N-terminalen Bereich des SUT2-Proteins und der Rest einen codierenden Bereich eines mit dem Saccharose-Stoffwechsel- und/oder -Transport in Verbindung stehenden Gens darstellt.

26. Nucleinsäuremolekül, das ein chimäres Protein codiert, wobei der 5'-terminale Bereich der codierenden Region des Nucleinsäuremoleküls den N-terminalen Bereich des SUT1-Gens und der Rest einen codierenden Bereich eines mit dem Saccharose-Stoffwechsel und/oder -Transport in Verbindung stehende Gens darstellt.

27. Nucleinsäuremolekül, welches ein chimäres Nucleinsäuremolekül darstellt und das für ein chimäres Protein codiert, dessen N-terminaler Bereich der N-terminale Bereich von SUT2 und dessen Rest codierende Sequenz von SUT1 ist.

28. Nucleinsäuremolekül, welches ein chimäres Nucleinsäuremolekül darstellt und das für ein chimäres Protein codiert, dessen N-terminaler Bereich von SUT1 und dessen Rest codierende Sequenz von SUT2 ist.

29. Nukleinsäuremolekül, welches ein chimäres Nucleinsäuremolekül darstellt und das für ein chimäres Protein codiert, dessen zentrale cytoplasmatische Domäne, die zwischen Membranspanne VI and VII

- 74 -

liegt, von SUT2 codiert wird, und dessen andere Bereiche von einem anderen Saccharosetransporter-Gen, insbesondere von SUT1 oder SUT4, codiert werden.

30. Vektor, enthaltend ein Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 19 bis 29.

31. Vektor nach Anspruch 30, enthaltend zusätzlich eine Saccharid-Transporter-codierende Nucleotidsequenz, einen Teil oder eine komplementäre Nucleotidsequenz davon.

32. Vektor nach einem der Ansprüche 30 bis 31, wobei das Nucleinsäuremolekül mit mindestens einem regulatorischen Element operativ verknüpft ist, das die Expression einer RNA in pro- und/oder eukaryotischen Zellen gewährleistet.

33. Vektor nach Anspruch 32, wobei das regulatorische Element ein Promotor ist.

34. Vektor nach Anspruch 33, wobei der Promotor der GAS, SUC2, SUT1, CaMV35S, rolC, enhanced PMA4, KAT1, StLS1/L700, PFP, patatin-B33, AAP1 oder Vicilin-Promotor ist.

35. Vektor nach einem der Ansprüche 30 bis 34, wobei das Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 19 bis 29 und/oder eine Saccharid-Transporter-codierenden Nucleotidsequenzen oder Teile davon in operativer Antisense-Orientierung zu dem mindestens einen regulatorischen Element angeordnet sind.

36. Wirtzelle, enthaltend einen der Vektoren nach einem der Ansprüche 30 bis 35.

- 75 -

37. Wirtzelle nach Anspruch 36, die eine Pflanzenzelle, Bakterienzelle oder Hefezelle ist.

38. Saccharid-Transporter mit niedriger Saccharid-Affinität und hohem Saccharid-Transportumsatz, codiert von einem Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 19 oder 20.

39. Protein mit der biologischen Aktivität eines Regulators und/oder Sensors des Saccharid-transport, codiert von einem Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 21.

40. Chimäres Protein codiert von einem der Nucleinsäuremoleküle nach einem der Ansprüche 25 bis 29.

41. Transgene Pflanzenzelle, die mit einem Nucleinsäuremoleküle nach einem der Ansprüche 19 bis 29 oder einem der Vektoren nach einem der Ansprüche 29 bis 34 transformiert wurde oder die von einer solchen Zelle abstammt.

42. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 41, die mit einem Vektor enthaltend eine SUT/SUC-codierende, bevorzugt eine SUT1-codierende Nucleotidsequenz transformiert wurde oder die von einer solchen Zelle abstammt.

43. Transgene Pflanzenzelle, deren Genom mindestens zwei stabil integrierte modifizierte Gene aus der SUT/SUC Genfamilie enthält.

44. Transgene Pflanzenzelle, deren Genom mindestens zwei stabil integrierte modifizierte Gene enthält,

- 76 -

ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SUT1/SUT2; SUT1/SUT4, SUT2/SUT4 und SUT1/SUT2/SUT4.

45. Transgene Pflanze, enthaltend mindestens eine Pflanzenzelle nach Anspruch 41, 42, 43 oder 44, oder hergestellt nach einem der Verfahren gemäß der Ansprüche 1 bis 18.

46. Transgene Pflanze nach Anspruch 45, wobei die Pflanze ausgewählt ist aus der Unterklasse der Graminae, Pinidae, Magnoliidae, Ranunculidae, Caryophyllidae, Rosidae, Asteridae, Aridae, Liliidae, Arecidae und Commelinidae.

47. Transgene Pflanze nach Anspruch 45, wobei die Pflanze ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Zuckerrübe, Zuckerrohr, Topinambur, Arabidopsis, Sonnenblume, Tomate, Tabak, Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Hafer, Reis, Kartoffel, Raps, Maniok, Salat, Spinat, Wein, Apfel, Kaffee, Tee, Banane, Kokos, Palmen, Erbsen, Bohnen, Pinien, Pappel, Eukalyptus etc.

48. Vermehrungs- oder Erntematerial einer Pflanze nach einem der Ansprüche 45, 46 oder 47, enthaltend mindestens eine Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 41, 42, 43 oder 44.

49. Verwendung einer Nucleotidsequenz nach einem der Ansprüche 19 oder 20 zum Identifizieren eines Modulators, insbesondere Inhibitors, des Saccharid-Transports in Pflanzen, insbesondere von SUT4.

50. Verwendung einer Nucleotidsequenz nach einem der Ansprüche 19 oder 20 zum Identifizieren eines

- 77 -

Interaktors, der wiederum zur Beeinflussung des Saccharid-Transports benutzt wird.

51. Verwendung nach Anspruch 49, wobei der Inhibitor die Phloembeladung in Source-Organen und/oder die Entladung in Sinkorganen inhibiert.

52. Verwendung einer Nucleotidsequenz nach Anspruch 21 zum Identifizieren eines Modulators, insbesondere Inhibitors des Saccharid-Transports in Pflanzen, insbesondere von SUT2.

53. Verwendung nach Anspruch 52, wobei der Inhibitor die Regulation oder Sensorik des Saccharid-Transportsystems inhibiert.

54. Verwendung einer Nucleotidsequenz nach einem der Ansprüche 19 bis 29 als molekularer Marker für Kreuzungsprogramme.

55. Verwendung einer 5'-terminalen Nucleotidsequenz eines Protein-codierenden Bereiches eines Gens aus der SUT/SUC-Genfamilie zur Modifikation der Affinität eines beliebigen Proteins, insbesondere aus der Familie der SUT/SUC-Proteine, gegenüber einem Substrat, insbesondere Saccharose.

56. Verwendung nach Anspruch 54, wobei das Gen SUT1, SUT2 oder SUT4 ist.

57. Verwendung nach Anspruch 54 oder 55, wobei die N-terminale Nucleotidsequenz die in SEQ ID-Nr. 24 oder 25 dargestellte Nucleotidsequenz ist.

- 78 -

58. Verwendung der zentralen cytoplasmatischen Schleife von SUT2 zur Regulation oder Signaltransduktion, insbesondere im Zuckerstoffwechsel.

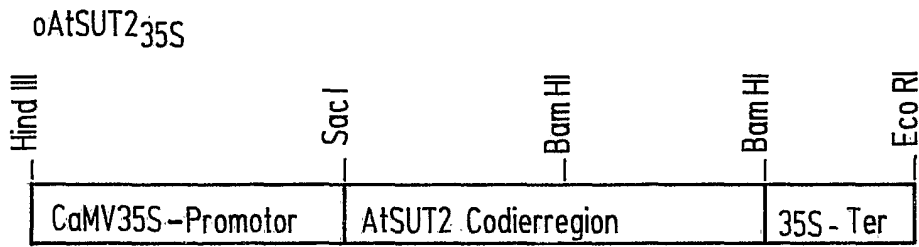


Fig.1

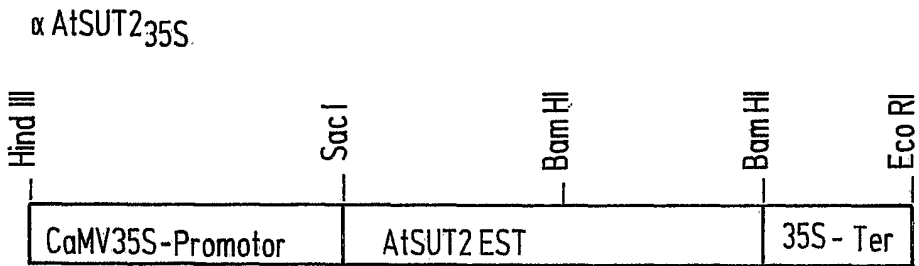


Fig.2

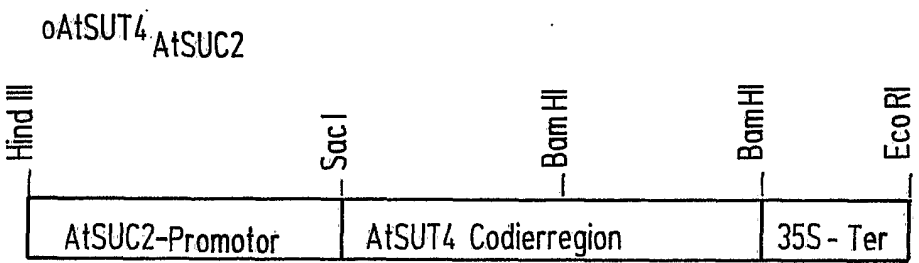


Fig.3

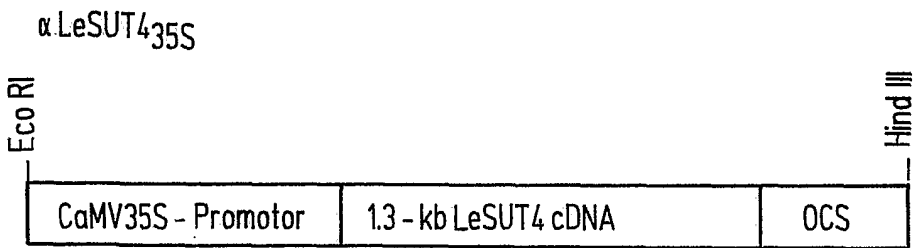


Fig.4

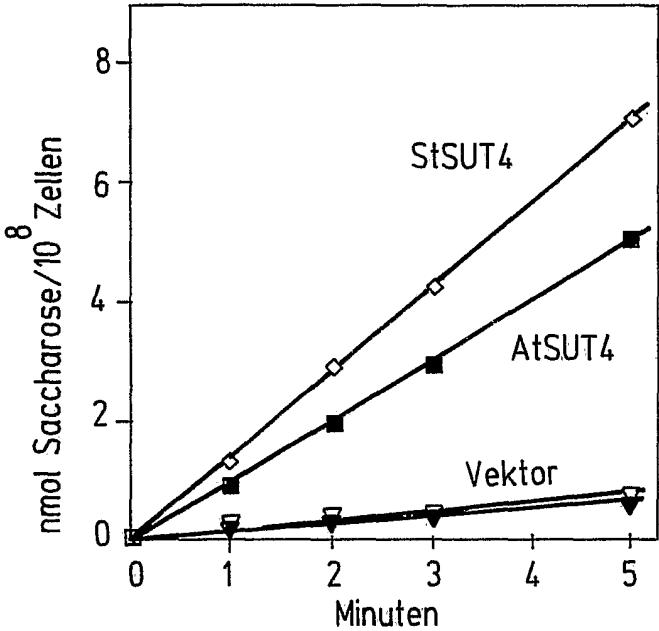


Fig.5A

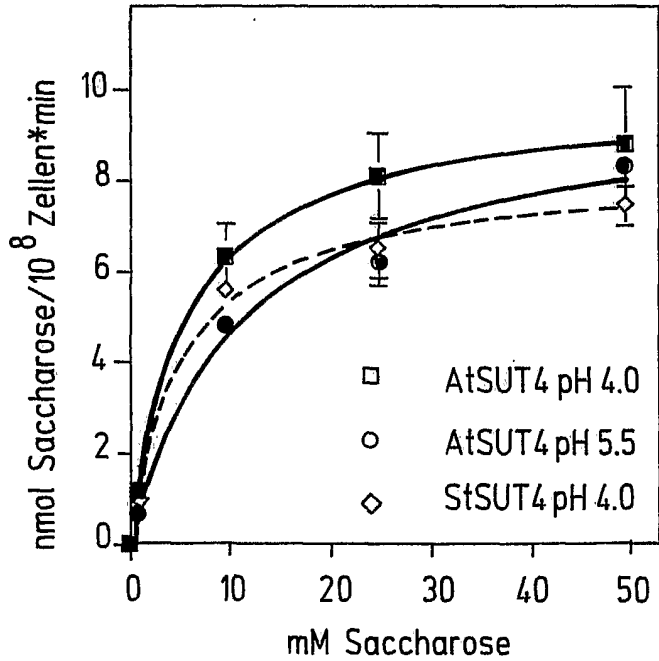


Fig.5B

3 / 4

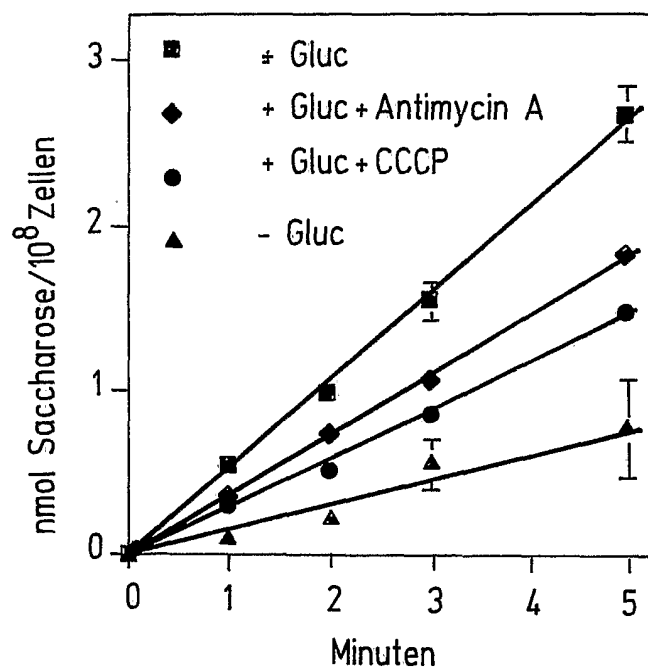


Fig.5C

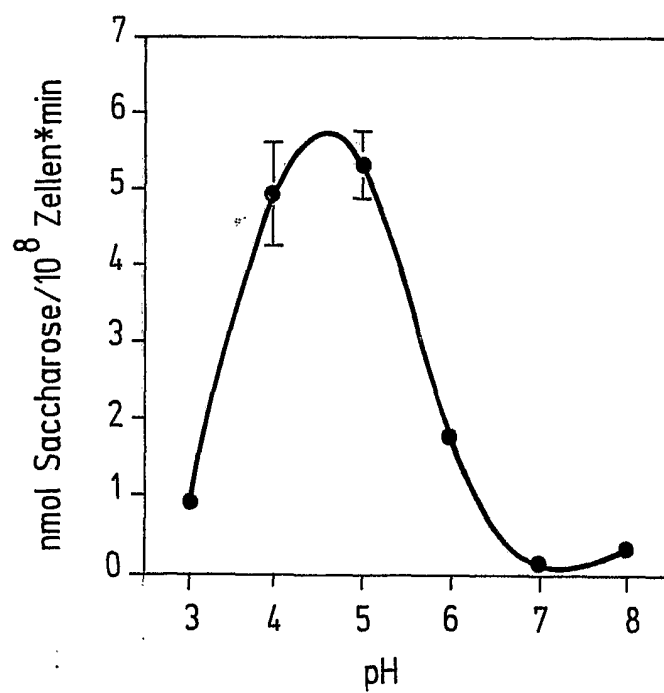


Fig.6

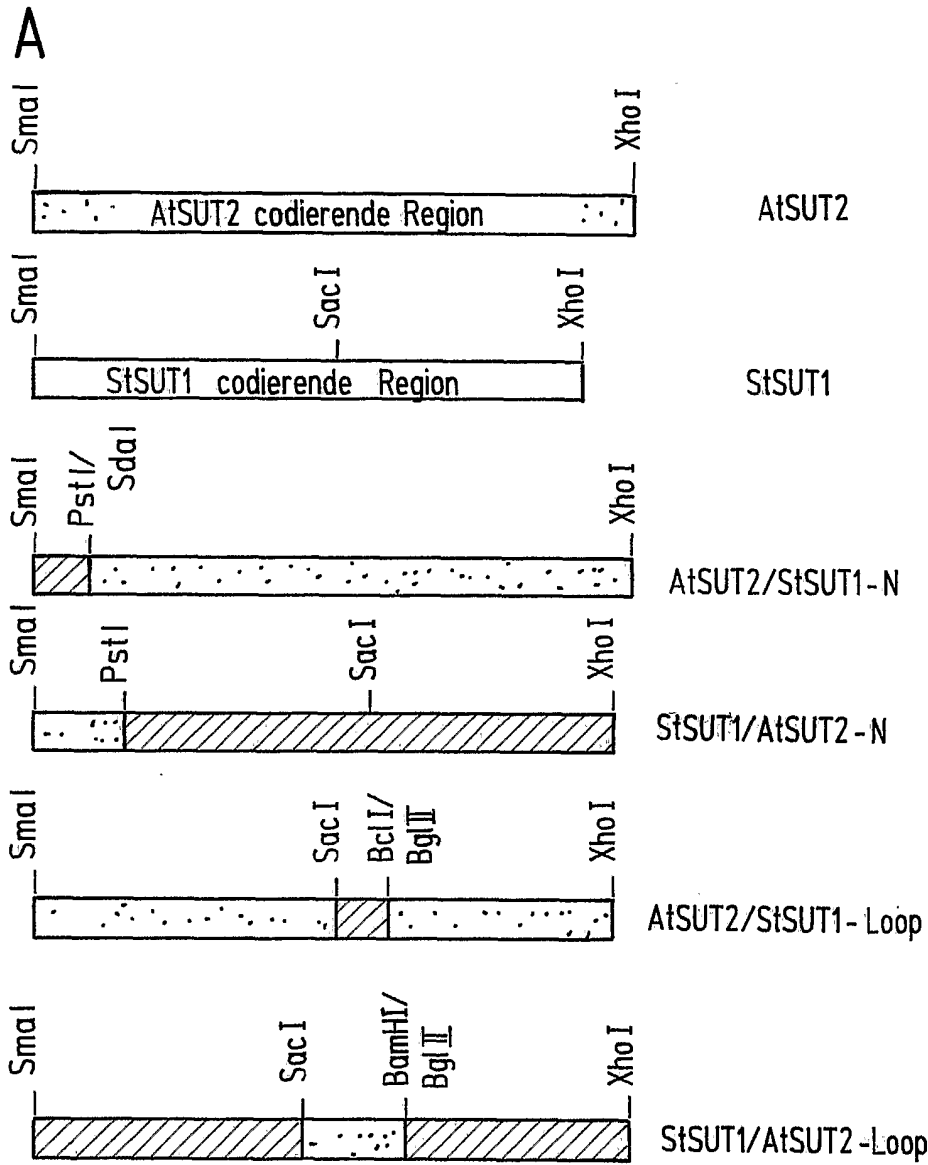


Fig.7

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Prof. Dr. Frommer, Wolf-Bernd

<120> Verfahren zur genetischen Modifizierung einer Pflanze

<130> 16513

<140>

<141>

<160> 30

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1533

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 1

```

atggctactt cogatcaaga tcgccgtcac agagccactc gcaaccgtcc accaatacct 60
cgaccctcta attcatcatc tcgtcccgtt gtacctcctc ctcgatcaaa agtttcgaag 120
cgtgtgcttc tcogtgtagc ttccgtcgca tgcgggattc aattcggatg ggcgcttcag 180
ctttcgcttc tcacacctta cgttcaagag ctagggatcc cacacgcttg ggctagtgtg 240
at ttggcttt gcggtcctct ctctggtttg ttctgtgcaac cgctcgttgg gcatagtagc 300
gatagggtgta ctagtaagta cggtcgtcgg agaccgttta ttgtcgccgg agctgtggcg 360
at ttctatct ctgttatggt tattggctcat gcggcgata ttggatgggc at ttggggat 420
agagaagggga agattaagoc gagggcgatt gttgcttttg ttttaggggt ttggattcct 480
gatgttgcta ataatatgac tcaaggctct tgtagagctc tcctcgctga tcttactgag 540
aatgataatc gcagaaccog ggtggcaaat ggctacttct ctctctttat ggctgttggc 600
aatgttcttg gctatgctac tggatcatac aatggttggg acaagatctt cacttttacg 660
aagacagttg catgtaatgt ggaatgtgcc aatctcaagt ctgccttcta catagatggt 720
gtctttattg caataactac gatcctaagc gtttcagcgg ctcatgaggt gcctcttgct 780
tcattgactt ctgaagcaca tgggcaaacc agtggaacag acgaagcttt tctttctgag 840
atattttggaa ctttcagata ttttcaggga aatgtttgga taatcttgct tgttacagca 900
ttgacatgga ttggttgggt tccatttatt ctggttgata ctgattggat gggtcgagag 960
atctatggcg gtgaaccgaa catagggact tcatatagtg ctggggtcag tatgggtgca 1020
cttggttttga tgttgaattc tgtttttctt ggaatcactt cgggtgctcat ggagaaactt 1080
tgcagaaagt ggggggctgg ttttgtttgg ggaatatcaa atatcttaat ggctatttgc 1140
tttcttggaa tgataatcac ctcatttggt gcgtctcacc ttggctacat tggccatgaa 1200
caacctcctg ccagcatcgt gtttgctgct gtgttaatct ttacaattct gggcattcca 1260
ttggcgataa cttacagcgt cccatatgog ttgatttcca tacgtattga atccctgggc 1320
ctagggtcaag gcttatcttt ggggtgtgcta aatttggcga tagtcatccc acaggtaatt 1380
gtgtctgttg gcagtggccc atgggatcaa ctggttggag gtgggaattc accggcactt 1440
gcagtaggag cagctacagg cttcattggc ggaattgtag ctatcttggc tottccacgg 1500
acaaggattc agaagcccat ccctctccca tga 1533

```

<210> 2

<211> 1503

<212> DNA

<213> *Lycopersicon esculentum*

<400> 2

```

atgccggaga tagaaaggca tagaacaagg cataaccgac cggcgattcg agaaccggtg 60
aaaccgagag taccactgag actattgttc cgagtagctt cggttgcggg tggaattcaa 120
ttcggttggg cgttacaact atcactgctc acaccttatg tgcaagagct tggaataccg 180
catgcttggg cgagcataat atggctctgt ggaccgcttt caggtttact ggttcagocct 240
ttagttagtc acatgagtga caagtgcaca agtcggttcg gtcgtcggcg cccgtttatt 300
gtcgccggag cagtatcgat catgattgog gtgttgatta tcggttttctc cgtgatattt 360
ggatggcttt taggtgatcg aggtgaaata aaagtgcgtg ctatagcggc gtttgtcgta 420
gggttttggc ttctcgatgt tgccaataat atgactcaag gaccttgcag agctctgctt 480
gctgatctta cacaaaagga tcatagaaga acccggttag caaatgcata tttttcctta 540
tttatggcca ttggtaacat cttggctttt gctactggat cttacagtgg ctggttcaag 600

```

```

atcttccctt ttactctcaa tactgcatgc accatcaact gtgccaatct aaaggctgct 660
tttattatcg acattatatt tattgcaaca actacatgca ttagcatatc agcggccaat 720
gagcagcctc tagatcccag tctgtggttc tctcatacca gagaagagat tggcgaaatca 780
agccatgggtc aagaagaagc ttttctctgg gagttggttg gaattttcaa gtatttccca 840
ggtgttggtt ggtgatccct gcttgtcact gccctgacat ggattggatg gtttccggtt 900
ctttgttcg atactgactg gtttggtcga gaaatttatg gcggtgaacc aaatgatgga 960
aagaattata gtgcaggagt gcgaatgggt tcattgggtc taatgttgaa ttctgtgctt 1020
cttgactaa cttcattgtt catggagaag ctctgtcgaa aatgggggtg tggtttcaca 1080
tggggagttt caaacgtggt catgtctctc tgttttatag ccatgcttat aattactgct 1140
gttaggagta acatagacat tggccagggt cttccaccgg atggcattgt gattgctgctg 1200
ctggttgat tttctattct tgggatccca ctagctataa catacagtgt tccatagctt 1260
ttagtatcct caaggattga tgctcttggg cttggacaag gcttgtcaat ggggtgtgctg 1320
aacctggcaa ttgtgttccc acagattgtg gtttctctgg gaagtgggcc atgggatgag 1380
ttatttgggtg gaggcaattc accagccttt gttgtggctg cgctttcagc atttgcgtgtt 1440
ggacttatag ccatcttggc gattcctcga acacgggttg agaaacccaa gatctttgca 1500
tga 1503

```

<210> 3

<211> 1785

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 3

```

atgagtgact cgggtgtcgat ctccggttccg tataggaatt tgaggaagga aattgaactt 60
gagacggtca ccaagcatcg tcaaaacgaa tctggttctt cgtcgttctc tgaatctgct 120
tctccttcga atcattctga ttccgctgat ggtgaatctg tgtcgaagaa ttgtagttaa 180
gtgacgttgg ttcttagttg tacagttgcc gctggagtgc aatttggttg ggcattgcaa 240
ctttctcttc ttactcctta tattcagacc cttggaatat cgcattgctt ttcttcggtt 300
atttggctgt gcgcccaat tacaggcctt gtggtccagc cttttgttgg catttgaggt 360
gataaatgta cttcaaagta tggagaaga cgaccattta ttctagttag atcattcatg 420
atctcaatag cagtataat aatcggattt tctgcagaca ttgggtatct gttaggagat 480
tcaaaggaac attgcagtac tttcaaaggc acacgaacca gggcagctgt tgtctttatc 540
attgggtttt ggttgttggg tctagcaaac aatacagtac agggacctgc tctgtctctt 600
ctagctgac tatcagggtcc tgatcagcgg aatactgcaa atgctgtgtt ctgcttgttg 660
atggctattg ggaacatcct tgggttttct gccggtgcta gcggaaaatg gcaagaatgg 720
ttcccttttt taactagtag agcatgttgt gctgcatgtg gaaatctcaa agcagcgttt 780
cttcttgtag tggcttttct cactatatgt actcttgtca caatctattt tgctaaagag 840
attcctttta caagcaacaa gccacccgc atacaagatt ctgcaccttt gttggatgat 900
ctccagtcca aaggccttga gcattcaaaa ttaaataatg gtactgcaa tgggaatcaag 960
tatgagagag tggaaactga tacggatgaa cagtttggca attcagagaa tgagcatcaa 1020
gatgagacct acgttgatgg ccttggatct gtttttagtg atttgctaac tagtttaagg 1080
catttgccac cggctatgca ctacagttct atcgatcatg ctcttacatg gttatcctgg 1140
ttccctttct ttctgttoga tacagatttg atgggaagag aagtttacca tggggatcca 1200
acaggagata gtttgcataa ggaactctat gatcaagggt tacgtgaagg tgcacttggt 1260
ttgctactaa actctgttgt tcttgggata agctcatttc tcattgaacc aatgtgtcag 1320
cggatgggtg ctccggttgt atgggctttg agcaatttta ctgtatttgc ctgcatggcg 1380
ggaacagctg taatcagctt gatgtctctc agtgatgaca aaaatggaat tgaatacata 1440
atgcgtggaa acgaaacaac aagaaccgca gccgtaatcg tttttgcaact ccttgggttt 1500
ccctagcta tcacatacag tgtccctttc tctgtcacag cagaagtcac tgctgattcc 1560
ggtggcggtc aagggttggc tataggagtg ttgaatctcg caatcgttat tccccagatg 1620
atagtatcac ttggagcggg tccatgggat caattgtttg gaggaggaaa cttacoggcg 1680
tttgttttgg cgtctgttgc tgctttcgtc gctggagtta ttgcattgca aaggcttccc 1740
acgctatcga gttctttcaa gtccaacggg ttccacatcg gctaa 1785

```

<210> 4

<211> 1355

<212> DNA

<213> *Lycopersicon esculentum*

<400> 4

```

ctgcagacat aggatactta ttgggggaca caaaagagca ttgcagcact ttcaaaggca 60
ctcgctcaag agcagocatt gtatttgtcg ttgggttttg gatgctcgat cttgctaata 120
atactgtgca ggggtccggc cgagctcttt tggcagattt gtcaggctct gatcaaagaa 180

```

```

atacogcaaa tgcgtgtgttc tgctcctgga tggctgtttgg aaacattctt ggattttctg 240
ctggagccag tggaggttgg cacagatggg ttccgttttt gacaaataga gcttgttgtg 300
agccatgtgg aaatctcaaa gcagcattct tagttgcagt ggtctttcta actctctgca 360
cgtagtaaac tctctacttc gccaatgaag tccactgtc acccaagcaa tataaacgct 420
tgtcagattc tgctcctctc ttggatagtc ctcagaatac tggctttgac ctttctcaat 480
caaaaaggga gttgcagtct gtaaatagtg tagcaaataa tgaatctgag atgggtcgtg 540
tagcagataa tagtccaaag aatgaagaac agagacctga caaggatcaa ggtgatagct 600
ttgctgatag cctgggagca gttttggtca atctgttgac cagcttacgt catttgcctc 660
ccgcaatgca ttcggttctc attgtcatgg ctctgacttg gttgccctgg tttccctttt 720
tcctttttga cacggattgg atggggagag aagtctatca tggggaccgg aaaggagaag 780
cagatgaagt aaatgcatat aaccaagggtg tcagagaagg tgcatttggg ttgctattga 840
attctgttgt tcttggcggt agctcctttt ttattgagcc aatgtgcaag tggattgggt 900
ctagacttgt ttgggctgtg agcaacttca ttgtatttgt ctgcatggcc tgcaccgcta 960
tcattagcgt ggtttccatc agtgcacata cggaggagggt ccaacatgtg attggtgcta 1020
ctaaatcaac tcaaattgct gctttggttg ttttctctct tcttggcatt cctcttgctg 1080
taacttacag tgtccctttc tctatcacag cagagttgac agctgacgt ggtgggtggc 1140
aagggttggc aataggagtc ctgaatcttg caatcgtttt acctcagatg gttgtctcgc 1200
ttggtgccgg tccatgggat gctttatttt gtggaggaaa cataccggca tttgtcttag 1260
catcttttag tgcatttgct gctggaattt ttgctatgct cagactacca aatttatcaa 1320
gtaatttcaa atcaactggc ttccattttg gttga 1355

```

<210> 5

<211> 510

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 5

```

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

```

195					200					205					
Ser	Tyr	Asn	Gly	Trp	Tyr	Lys	Ile	Phe	Thr	Phe	Thr	Lys	Thr	Val	Ala
210					215					220					
Cys	Asn	Val	Glu	Cys	Ala	Asn	Leu	Lys	Ser	Ala	Phe	Tyr	Ile	Asp	Val
225					230					235					240
Val	Phe	Ile	Ala	Ile	Thr	Thr	Ile	Leu	Ser	Val	Ser	Ala	Ala	His	Glu
				245					250					255	
Val	Pro	Leu	Ala	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Ala	His	Gly	Gln	Thr	Ser	Gly
			260					265					270		
Thr	Asp	Glu	Ala	Phe	Leu	Ser	Glu	Ile	Phe	Gly	Thr	Phe	Arg	Tyr	Phe
		275					280					285			
Pro	Gly	Asn	Val	Trp	Ile	Ile	Leu	Leu	Val	Thr	Ala	Leu	Thr	Trp	Ile
	290					295					300				
Gly	Trp	Phe	Pro	Phe	Ile	Leu	Phe	Asp	Thr	Asp	Trp	Met	Gly	Arg	Glu
305					310					315					320
Ile	Tyr	Gly	Gly	Glu	Pro	Asn	Ile	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Ala	Gly	Val
				325					330					335	
Ser	Met	Gly	Ala	Leu	Gly	Leu	Met	Leu	Asn	Ser	Val	Phe	Leu	Gly	Ile
			340					345					350		
Thr	Ser	Val	Leu	Met	Glu	Lys	Leu	Cys	Arg	Lys	Trp	Gly	Ala	Gly	Phe
		355					360					365			
Val	Trp	Gly	Ile	Ser	Asn	Ile	Leu	Met	Ala	Ile	Cys	Phe	Leu	Gly	Met
	370					375					380				
Ile	Ile	Thr	Ser	Phe	Val	Ala	Ser	His	Leu	Gly	Tyr	Ile	Gly	His	Glu
385					390					395					400
Gln	Pro	Pro	Ala	Ser	Ile	Val	Phe	Ala	Ala	Val	Leu	Ile	Phe	Thr	Ile
				405					410					415	
Leu	Gly	Ile	Pro	Leu	Ala	Ile	Thr	Tyr	Ser	Val	Pro	Tyr	Ala	Leu	Ile
			420					425					430		
Ser	Ile	Arg	Ile	Glu	Ser	Leu	Gly	Leu	Gly	Gln	Gly	Leu	Ser	Leu	Gly
		435					440					445			
Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Ile	Val	Ile	Pro	Gln	Val	Ile	Val	Ser	Val	Gly
	450					455					460				
Ser	Gly	Pro	Trp	Asp	Gln	Leu	Phe	Gly	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Ala	Leu
465					470					475					480
Ala	Val	Gly	Ala	Ala	Thr	Gly	Phe	Ile	Gly	Gly	Ile	Val	Ala	Ile	Leu
				485					490					495	
Ala	Leu	Pro	Arg	Thr	Arg	Ile	Gln	Lys	Pro	Ile	Pro	Leu	Pro		
			500					505					510		

<210> 6

<211> 500

<212> PRT

<213> Lycopersicon esculentum

<400> 6

```

Met  Pro  Glu  Ile  Glu  Arg  His  Arg  Thr  Arg  His  Asn  Arg  Pro  Ala  Ile
 1              5              10              15

Arg  Glu  Pro  Val  Lys  Pro  Arg  Val  Pro  Leu  Arg  Leu  Leu  Phe  Arg  Val
              20              25              30

Ala  Ser  Val  Ala  Gly  Gly  Ile  Gln  Phe  Gly  Trp  Ala  Leu  Gln  Leu  Ser
              35              40              45

Leu  Leu  Thr  Pro  Tyr  Val  Gln  Glu  Leu  Gly  Ile  Pro  His  Ala  Trp  Ala
 50              55              60

Ser  Ile  Ile  Trp  Leu  Cys  Gly  Pro  Leu  Ser  Gly  Leu  Leu  Val  Gln  Pro
 65              70              75              80

Leu  Val  Gly  His  Met  Ser  Asp  Lys  Cys  Thr  Ser  Arg  Phe  Gly  Arg  Arg
              85              90              95

Arg  Pro  Phe  Ile  Val  Ala  Gly  Ala  Val  Ser  Ile  Met  Ile  Ala  Val  Leu
              100              105              110

Ile  Ile  Gly  Phe  Ser  Ala  Asp  Ile  Gly  Trp  Leu  Leu  Gly  Asp  Arg  Gly
 115              120              125

Glu  Ile  Lys  Val  Arg  Ala  Ile  Ala  Ala  Phe  Val  Val  Gly  Phe  Trp  Leu
 130              135              140

Leu  Asp  Val  Ala  Asn  Asn  Met  Thr  Gln  Gly  Pro  Cys  Arg  Ala  Leu  Leu
 145              150              155              160

Ala  Asp  Leu  Thr  Gln  Lys  Asp  His  Arg  Arg  Thr  Arg  Val  Ala  Asn  Ala
              165              170              175

Tyr  Phe  Ser  Leu  Phe  Met  Ala  Ile  Gly  Asn  Ile  Leu  Gly  Phe  Ala  Thr
              180              185              190

Gly  Ser  Tyr  Ser  Gly  Trp  Phe  Lys  Ile  Phe  Pro  Phe  Thr  Leu  Asn  Thr
              195              200              205

Ala  Cys  Thr  Ile  Asn  Cys  Ala  Asn  Leu  Lys  Ala  Ala  Phe  Ile  Ile  Asp
 210              215              220

Ile  Ile  Phe  Ile  Ala  Thr  Thr  Thr  Cys  Ile  Ser  Ile  Ser  Ala  Ala  Asn
 225              230              235              240

Glu  Gln  Pro  Leu  Asp  Pro  Ser  Arg  Gly  Ser  Ser  His  Thr  Arg  Glu  Glu
              245              250              255

Ile  Gly  Glu  Ser  Ser  His  Gly  Gln  Glu  Glu  Ala  Phe  Leu  Trp  Glu  Leu
              260              265              270

Phe  Gly  Ile  Phe  Lys  Tyr  Phe  Pro  Gly  Val  Val  Trp  Val  Ile  Leu  Leu
              275              280              285

Val  Thr  Ala  Leu  Thr  Trp  Ile  Gly  Trp  Phe  Pro  Phe  Leu  Leu  Phe  Asp
 290              295              300

Thr  Asp  Trp  Phe  Gly  Arg  Glu  Ile  Tyr  Gly  Gly  Glu  Pro  Asn  Asp  Gly
 305              310              315              320

Lys  Asn  Tyr  Ser  Ala  Gly  Val  Arg  Met  Gly  Ser  Leu  Gly  Leu  Met  Leu
              325              330              335

```

Asn Ser Val Leu Leu Gly Leu Thr Ser Leu Phe Met Glu Lys Leu Cys
 340 345 350
 Arg Lys Trp Gly Ala Gly Phe Thr Trp Gly Val Ser Asn Val Val Met
 355 360 365
 Ser Leu Cys Phe Ile Ala Met Leu Ile Ile Thr Ala Val Arg Ser Asn
 370 375 380
 Ile Asp Ile Gly Gln Gly Leu Pro Pro Asp Gly Ile Val Ile Ala Ala
 385 390 395 400
 Leu Val Val Phe Ser Ile Leu Gly Ile Pro Leu Ala Ile Thr Tyr Ser
 405 410 415
 Val Pro Tyr Ala Leu Val Ser Ser Arg Ile Asp Ala Leu Gly Leu Gly
 420 425 430
 Gln Gly Leu Ser Met Gly Val Leu Asn Leu Ala Ile Val Phe Pro Gln
 435 440 445
 Ile Val Val Ser Leu Gly Ser Gly Pro Trp Asp Glu Leu Phe Gly Gly
 450 455 460
 Gly Asn Ser Pro Ala Phe Val Val Ala Ala Leu Ser Ala Phe Ala Gly
 465 470 475 480
 Gly Leu Ile Ala Ile Leu Ala Ile Pro Arg Thr Arg Val Glu Lys Pro
 485 490 495
 Lys Ile Phe Ala
 500

<210> 7

<211> 594

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 7

Met Ser Asp Ser Val Ser Ile Ser Val Pro Tyr Arg Asn Leu Arg Lys
 1 5 10 15
 Glu Ile Glu Leu Glu Thr Val Thr Lys His Arg Gln Asn Glu Ser Gly
 20 25 30
 Ser Ser Ser Phe Ser Glu Ser Ala Ser Pro Ser Asn His Ser Asp Ser
 35 40 45
 Ala Asp Gly Glu Ser Val Ser Lys Asn Cys Ser Leu Val Thr Leu Val
 50 55 60
 Leu Ser Cys Thr Val Ala Ala Gly Val Gln Phe Gly Trp Ala Leu Gln
 65 70 75 80
 Leu Ser Leu Leu Thr Pro Tyr Ile Gln Thr Leu Gly Ile Ser His Ala
 85 90 95
 Phe Ser Ser Phe Ile Trp Leu Cys Gly Pro Ile Thr Gly Leu Val Val
 100 105 110
 Gln Pro Phe Val Gly Ile Trp Ser Asp Lys Cys Thr Ser Lys Tyr Gly
 115 120 125

Arg Arg Arg Pro Phe Ile Leu Val Gly Ser Phe Met Ile Ser Ile Ala
 130 135 140
 Val Ile Ile Ile Gly Phe Ser Ala Asp Ile Gly Tyr Leu Leu Gly Asp
 145 150 155 160
 Ser Lys Glu His Cys Ser Thr Phe Lys Gly Thr Arg Thr Arg Ala Ala
 165 170 175
 Val Val Phe Ile Ile Gly Phe Trp Leu Leu Asp Leu Ala Asn Asn Thr
 180 185 190
 Val Gln Gly Pro Ala Arg Ala Leu Leu Ala Asp Leu Ser Gly Pro Asp
 195 200 205
 Gln Arg Asn Thr Ala Asn Ala Val Phe Cys Leu Trp Met Ala Ile Gly
 210 215 220
 Asn Ile Leu Gly Phe Ser Ala Gly Ala Ser Gly Lys Trp Gln Glu Trp
 225 230 235 240
 Phe Pro Phe Leu Thr Ser Arg Ala Cys Cys Ala Ala Cys Gly Asn Leu
 245 250 255
 Lys Ala Ala Phe Leu Leu Ala Val Val Phe Leu Thr Ile Cys Thr Leu
 260 265 270
 Val Thr Ile Tyr Phe Ala Lys Glu Ile Pro Phe Thr Ser Asn Lys Pro
 275 280 285
 Thr Arg Ile Gln Asp Ser Ala Pro Leu Leu Asp Asp Leu Gln Ser Lys
 290 295 300
 Gly Leu Glu His Ser Lys Leu Asn Asn Gly Thr Ala Asn Gly Ile Lys
 305 310 315 320
 Tyr Glu Arg Val Glu Arg Asp Thr Asp Glu Gln Phe Gly Asn Ser Glu
 325 330 335
 Asn Glu His Gln Asp Glu Thr Tyr Val Asp Gly Pro Gly Ser Val Leu
 340 345 350
 Val Asn Leu Leu Thr Ser Leu Arg His Leu Pro Pro Ala Met His Ser
 355 360 365
 Val Leu Ile Val Met Ala Leu Thr Trp Leu Ser Trp Phe Pro Phe Phe
 370 375 380
 Leu Phe Asp Thr Asp Trp Met Gly Arg Glu Val Tyr His Gly Asp Pro
 385 390 395 400
 Thr Gly Asp Ser Leu His Met Glu Leu Tyr Asp Gln Gly Val Arg Glu
 405 410 415
 Gly Ala Leu Gly Leu Leu Leu Asn Ser Val Val Leu Gly Ile Ser Ser
 420 425 430
 Phe Leu Ile Glu Pro Met Cys Gln Arg Met Gly Ala Arg Val Val Trp
 435 440 445
 Ala Leu Ser Asn Phe Thr Val Phe Ala Cys Met Ala Gly Thr Ala Val
 450 455 460
 Ile Ser Leu Met Ser Leu Ser Asp Asp Lys Asn Gly Ile Glu Tyr Ile
 465 470 475 480

```
<210> 8
<211> 450
<212> PRT
<213> Lycopersicon esculentum
```

```

<400> 8
Ala Asp Ile Gly Tyr Leu Leu Gly Asp Thr Lys Glu His Cys Ser Thr
  1      5      10     15
Phe Lys Gly Thr Arg Ser Arg Ala Ala Ile Val Phe Val Val Gly Phe
      20     25     30
Trp Met Leu Asp Leu Ala Asn Asn Thr Val Gln Gly Pro Ala Arg Ala
    35      40      45
Leu Leu Ala Asp Leu Ser Gly Pro Asp Gln Arg Asn Thr Ala Asn Ala
    50      55      60
Val Phe Cys Ser Trp Met Ala Val Gly Asn Ile Leu Gly Phe Ser Ala
    65      70      75      80
Gly Ala Ser Gly Gly Trp His Arg Trp Phe Pro Phe Leu Thr Asn Arg
      85      90      95
Ala Cys Cys Glu Pro Cys Gly Asn Leu Lys Ala Ala Phe Leu Val Ala
    100     105     110
Val Val Phe Leu Thr Leu Cys Thr Leu Val Thr Leu Tyr Phe Ala Asn
    115     120     125
Glu Val Pro Leu Ser Pro Lys Gln Tyr Lys Arg Leu Ser Asp Ser Ala
    130     135     140
Pro Leu Leu Asp Ser Pro Gln Asn Thr Gly Phe Asp Leu Ser Gln Ser
    145     150     155     160
Lys Arg Glu Leu Gln Ser Val Asn Ser Val Ala Asn Asn Glu Ser Glu
      165     170     175

```

Met Gly Arg Val Ala Asp Asn Ser Pro Lys Asn Glu Glu Gln Arg Pro
 180 185 190
 Asp Lys Asp Gln Gly Asp Ser Phe Ala Asp Ser Pro Gly Ala Val Leu
 195 200 205
 Val Asn Leu Leu Thr Ser Leu Arg His Leu Pro Pro Ala Met His Ser
 210 215 220
 Val Leu Ile Val Met Ala Leu Thr Trp Leu Pro Trp Phe Pro Phe Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Asp Thr Asp Trp Met Gly Arg Glu Val Tyr His Gly Asp Pro
 245 250 255
 Lys Gly Glu Ala Asp Glu Val Asn Ala Tyr Asn Gln Gly Val Arg Glu
 260 265 270
 Gly Ala Phe Gly Leu Leu Leu Asn Ser Val Val Leu Gly Val Ser Ser
 275 280 285
 Phe Leu Ile Glu Pro Met Cys Lys Trp Ile Gly Ser Arg Leu Val Trp
 290 295 300
 Ala Val Ser Asn Phe Ile Val Phe Val Cys Met Ala Cys Thr Ala Ile
 305 310 315 320
 Ile Ser Val Val Ser Ile Ser Ala His Thr Glu Gly Val Gln His Val
 325 330 335
 Ile Gly Ala Thr Lys Ser Thr Gln Ile Ala Ala Leu Val Val Phe Ser
 340 345 350
 Leu Leu Gly Ile Pro Leu Ala Val Thr Tyr Ser Val Pro Phe Ser Ile
 355 360 365
 Thr Ala Glu Leu Thr Ala Asp Ala Gly Gly Gly Gln Gly Leu Ala Ile
 370 375 380
 Gly Val Leu Asn Leu Ala Ile Val Leu Pro Gln Met Val Val Ser Leu
 385 390 395 400
 Gly Ala Gly Pro Trp Asp Ala Leu Phe Gly Gly Gly Asn Ile Pro Ala
 405 410 415
 Phe Val Leu Ala Ser Leu Ala Ala Leu Ala Ala Gly Ile Phe Ala Met
 420 425 430
 Leu Arg Leu Pro Asn Leu Ser Ser Asn Phe Lys Ser Thr Gly Phe His
 435 440 445
 Phe Gly
 450

<210> 9
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 9
 gatgcactcg aaatcagcca atttttagac

<210> 10
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Agrobacterium tumefaciens

<400> 10
 tcatgggaga gggatgggct tctgaatc 28

<210> 11
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 11
 atggctactt ccgatcaaga tcgccgtc 28

<210> 12
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Lycopersicon esculentum

<400> 12
 gactctgcag cgagaaatgg ctacttccg 29

<210> 13
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Lycopersicon esculentum

<400> 13
 taacctgcag gagaatctca tgggagagg 29

<210> 14
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Lycopersicon esculentum

<400> 14
 gagactgcag atgccggaga tagaaaggc 29

<210> 15
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Lycopersicon esculentum

<400> 15
 tatgacagcg gccgctcatg caaagatctt ggg 33

<210> 16
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Lycopersicon esculentum

<400> 16
 Met Pro Glu Ile Glu Arg His Arg Thr Arg His Asn Arg Pro Ala Ile
 1 5 10 15

Arg Glu Pro Val Lys Pro Arg

20

<210> 17
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Lycopersicon esculentum

<400> 17
 Gly Ser Ser His Thr Gly Glu Glu Ile Asp Glu Ser Ser His Gly Gln
 1 5 10 15
 Glu Glu Ala Phe Leu Trp
 20

<210> 18
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 18
 atggctgacc agatttgac 19

<210> 19
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 19
 gtttcatatt aatttcac 18

<210> 20
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 20
 tacgagaatt cgatctgtgt gttgaggacg 30

<210> 21
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 21
 agaggctcga gtggtcaaaa agaatcg 27

<210> 22
 <211> 1548
 <212> DNA
 <213> Solanum tuberosum

<400> 22
 atggagaatg gtacaaaaag agaaggttta gggaaactta cagtttcatc ttctctacaa 60
 gttgaacagc ctttagcacc atcaaagcta tggaaaatta tagttgtagc ttccatagct 120
 gctggtgttc aatttggttg ggctcttcag ctctctttgc ttacacotta tgttcaattg 180
 ctcggaattc ctcataaatt tgcccttttt atttggtttt gtggaccgat ttctggtatg 240
 attgttcagc cagttgtcgg ctactacagt gataattgct cctcccgttt cggtcgccgc 300

```

cggccattca ttgccgcgag agctgcactt gttatgattg cggtttttct catcggtattc 360
gccgcgcgacc ttgggtcacgc ctccgggtgac actctcggaa aaggatttta gccacgtgcc 420
attgccgttt tcgtcgtcgg cttttggatc cttgatgttg ctaacaacat gttacagggc 480
ccatgcagag cactactggc tgatctctcc ggcggaat cgggcaggat gagaacagca 540
aatgcttttt tctcattctt catggccgct ggaaacattc tgggggtacgc cgccggttca 600
tattctcacc tctttaaagt attccccctt tcaaaaacca aagcctgcga catgtactgc 660
gcaaattctga agagttgttt cttcatcgct atattccttt tactcagctt aacaaccata 720
gccttaacct tagtccggga aaacgagctc cgggagaaag acgagcaaga aatcgacgag 780
aaattagccg gcgccggaaa atcgaaagta ccgtttttcg gtgaaatttt tggggctttg 840
aaagaattac ctgcaccgat gtggattctt ctattagtaa cctgtttgaa ctggatcgcg 900
tggtttccct ttttcttata cgatacagat tggatggcta aggaggtttt cgggtggacaa 960
gtcgggtgatg cgaggttgta cgatttgggt gtacgcgctg gtgcaatggg attactgttg 1020
caatctgttg ttctagggtt tatgtcactt ggggttgaat tcttagggaa gaagattggt 1080
ggtgctaaga ggttatgggg aattttgaac tttgttttgg ctatttgctt ggctatgacc 1140
attttgggtca ccaaatggc cgagaaatct cgccagcacg accccgcggg cacacttatg 1200
gggcccgcgc ctggtgttaa aatcggtgcc ttgcttctct ttgccgccct tggatttctt 1260
cttgccggcaa ctttttagtat tccatttgct ttggcatcta ttttttctag taatcggtgt 1320
tcaggacaag gtttgtcact aggagtgtc aatcttgcaa ttgttgtaac acagatgttg 1380
gtgtcactag taggagggcc atgggatgat ttgtttggag gaggaactt gcctggattt 1440
gtagttggag cagttgcagc tgccgcgagc gctgttttag cactcacaat gttgccatct 1500
ccacctgctg atgctaagcc agcagtcgcc atgggcggtt tccattaa 1548

```

<210> 23

<211> 515

<212> PRT

<213> Solanum tuberosum

<400> 23

```

Met Glu Asn Gly Thr Lys Arg Glu Gly Leu Gly Lys Leu Thr Val Ser
  1              5              10              15

Ser Ser Leu Gln Val Glu Gln Pro Leu Ala Pro Ser Lys Leu Trp Lys
      20              25              30

Ile Ile Val Val Ala Ser Ile Ala Ala Gly Val Gln Phe Gly Trp Ala
      35              40              45

Leu Gln Leu Ser Leu Leu Thr Pro Tyr Val Gln Leu Leu Gly Ile Pro
      50              55              60

His Lys Phe Ala Ser Phe Ile Trp Leu Cys Gly Pro Ile Ser Gly Met
      65              70              75              80

Ile Val Gln Pro Val Val Gly Tyr Tyr Ser Asp Asn Cys Ser Ser Arg
      85              90              95

Phe Gly Arg Arg Arg Pro Phe Ile Ala Ala Gly Ala Ala Leu Val Met
      100             105             110

Ile Ala Val Phe Leu Ile Gly Phe Ala Ala Asp Leu Gly His Ala Ser
      115             120             125

Gly Asp Thr Leu Gly Lys Gly Phe Lys Pro Arg Ala Ile Ala Val Phe
      130             135             140

Val Val Gly Phe Trp Ile Leu Asp Val Ala Asn Asn Met Leu Gln Gly
      145             150             155             160

Pro Cys Arg Ala Leu Leu Ala Asp Leu Ser Gly Gly Lys Ser Gly Arg
      165             170             175

Met Arg Thr Ala Asn Ala Phe Phe Ser Phe Phe Met Ala Val Gly Asn
      180             185             190

```

Ile Leu Gly Tyr Ala Ala Gly Ser Tyr Ser His Leu Phe Lys Val Phe
 195 200 205
 Pro Phe Ser Lys Thr Lys Ala Cys Asp Met Tyr Cys Ala Asn Leu Lys
 210 215 220
 Ser Cys Phe Phe Ile Ala Ile Phe Leu Leu Leu Ser Leu Thr Thr Ile
 225 230 235 240
 Ala Leu Thr Leu Val Arg Glu Asn Glu Leu Pro Glu Lys Asp Glu Gln
 245 250 255
 Glu Ile Asp Glu Lys Leu Ala Gly Ala Gly Lys Ser Lys Val Pro Phe
 260 265 270
 Phe Gly Glu Ile Phe Gly Ala Leu Lys Glu Leu Pro Arg Pro Met Trp
 275 280 285
 Ile Leu Leu Leu Val Thr Cys Leu Asn Trp Ile Ala Trp Phe Pro Phe
 290 295 300
 Phe Leu Tyr Asp Thr Asp Trp Met Ala Lys Glu Val Phe Gly Gly Gln
 305 310 315 320
 Val Gly Asp Ala Arg Leu Tyr Asp Leu Gly Val Arg Ala Gly Ala Met
 325 330 335
 Gly Leu Leu Leu Gln Ser Val Val Leu Gly Phe Met Ser Leu Gly Val
 340 345 350
 Glu Phe Leu Gly Lys Lys Ile Gly Gly Ala Lys Arg Leu Trp Gly Ile
 355 360 365
 Leu Asn Phe Val Leu Ala Ile Cys Leu Ala Met Thr Ile Leu Val Thr
 370 375 380
 Lys Met Ala Glu Lys Ser Arg Gln His Asp Pro Ala Gly Thr Leu Met
 385 390 395 400
 Gly Pro Thr Pro Gly Val Lys Ile Gly Ala Leu Leu Leu Phe Ala Ala
 405 410 415
 Leu Gly Ile Pro Leu Ala Ala Thr Phe Ser Ile Pro Phe Ala Leu Ala
 420 425 430
 Ser Ile Phe Ser Ser Asn Arg Gly Ser Gly Gln Gly Leu Ser Leu Gly
 435 440 445
 Val Leu Asn Leu Ala Ile Val Val Pro Gln Met Leu Val Ser Leu Val
 450 455 460
 Gly Gly Pro Trp Asp Asp Leu Phe Gly Gly Gly Asn Leu Pro Gly Phe
 465 470 475 480
 Val Val Gly Ala Val Ala Ala Ala Ala Ser Ala Val Leu Ala Leu Thr
 485 490 495
 Met Leu Pro Ser Pro Pro Ala Asp Ala Lys Pro Ala Val Ala Met Gly
 500 505 510
 Gly Phe His
 515

<210> 24
 <211> 239
 <212> DNA
 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 24
 atgagtgcac cggtgtcgat ctccggttccg tataggaatt tgaggaagga aattgaactt 60
 gagacgggtca ccaagcatcg tcaaaacgaa tctgggttctt cgtcgtttctc tgaatctgct 120
 tctccttcga atcatttctga ttccggtgat ggtgaatctg tgtcgaagaa ttgtagttaa 180
 gtgacgttgg ttcttagttg tacagttgcc gctggagttc aatttggttg ggcattgca 239

<210> 25
 <211> 149
 <212> DNA
 <213> *Solanum tuberosum*

<400> 25
 atggagaatg gtacaaaaag agaaggttta gggaaactta cagtttcatc ttctctacaa 60
 gttgaacagc ctttagcacc atcaaagcta tggaaaatta tagttgtagc ttccatagct 120
 gctggtgttc aatttggttg ggctcttca 149

<210> 26
 <211> 288
 <212> DNA
 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 26
 tcctttttaca agcaacaagc ccaccgcgat acaagattct gcacctttgt tggatgatct 60
 ccagtcctaaa ggccttgagc attcaaaatt aaataatggg actgccaatg gaatcaagta 120
 tgagagagtg gaacgtgata cggatgaaca gtttggcaat tcagagaatg agcatcaaga 180
 tgagacctac gttgatggcc ctggatctgt tttagtgaat ttgctaacta gtttaaggca 240
 tttgccaccg gctatgcact cagttcttat cgtcatggct cttacatg 288

<210> 27
 <211> 1503
 <212> DNA
 <213> *Solanum tuberosum*

<400> 27
 atgccggaga tagaaaggca tagaacaagg cataaccgac cggcgattcg agaaccggtg 60
 aaaccgagag taccactgag actattgttc cgagttagctt cggttgccgg tgggaattcaa 120
 ttccggttggg cgttacaact atcactgctc acaccttatg tgcaagagct tgggaataaccg 180
 catgcttggg cgagcataat atggctctgt ggaccgcttt caggtttact gggttcagcct 240
 ttagtaggtc acatgagtga caagtgcaca agtcggttcg gtcgtcggcg cccggtttatt 300
 gtcgccggag cagtatcgat catgattgctg gtgttgatta tcggtttctc cgctgatatt 360
 ggatggcctt taggtgatcg aggtgaaata aaagtgcgtg ctatagcggc gtttgtcgta 420
 gggttttggc ttctcgatgt tgccaataat atgactcaag gaccttgacg agctctgctt 480
 gctgatctta cacaaaagga tcatagaaga acccgggtag caaatgcata tttttcctta 540
 tttatggcca ttggttaacat ccttggtctt gctactggat cttacagtgg ctgggttcaag 600
 atcttccctt ttactctcaa tactgcatgc accatcaact gtgccaatct aaaggctgct 660
 ttattatcgc acattatttt tattgcaaca actacatgca ttagcatatc agcggccaat 720
 gagcagcctc tagatcccag tcgtggttcc tctcatacca gagaagagat tggcgaatca 780
 agccatggtc aagaagaagc ttttctctgg gagttgtttg gaattttcaa gtatttcca 840
 ggtgttgttt ggggtgatcct gcttgtcact gccctgacat ggattggatg gtttccggtt 900
 cttttgttcg atactgactg gtttggctga gaaatttatg gcggtgaacc aaatgatgga 960
 aagaattata gtgcaggagt gcgaatgggt tcattgggtc taatgttgaa ttctgtgctt 1020
 cttggactaa cttcattgtt catggagaag ctctgtcgaa aatgggggtg tgggttcaca 1080
 tggggagtgt caaacgtggg catgtctctc tgttttatag ccatgcttat aattactgct 1140
 gttaggagta acatagacat tggccagggt cttccaccgg atggcattgt gattgtctgcg 1200
 ctgggttgat tttctattct tgggatccca ctacataaa catacagtgt tccatatgct 1260
 ttagtatcct caaggattga tgctcttggg cttggacaag gcttgtcaat ggggtgtgctg 1320
 aacctggcaa ttgtgttccc acagattgtg gtttctctgg gaagtgggcc atgggatgag 1380

ttatttgggtg gaggcaattc accagccttt gttgtggctg cgctttcagc atttgctggt 1440
 ggacttatag ccattcttggc gattcctoga acacgggttg agaaacccaa gatctttgca 1500
 tga 1503

<210> 28
 <211> 500
 <212> PRT
 <213> Solanum tuberosum

<400> 28

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

Val Thr Ala Leu Thr Trp Ile Gly Trp Phe Pro Phe Leu Leu Phe Asp
 290 295 300
 Thr Asp Trp Phe Gly Arg Glu Ile Tyr Gly Gly Glu Pro Asn Asp Gly
 305 310 315 320
 Lys Asn Tyr Ser Ala Gly Val Arg Met Gly Ser Leu Gly Leu Met Leu
 325 330 335
 Asn Ser Val Leu Leu Gly Leu Thr Ser Leu Phe Met Glu Lys Leu Cys
 340 345 350
 Arg Lys Trp Gly Ala Gly Phe Thr Trp Gly Val Ser Asn Val Val Met
 355 360 365
 Ser Leu Cys Phe Ile Ala Met Leu Ile Ile Thr Ala Val Arg Ser Asn
 370 375 380
 Ile Asp Ile Gly Gln Gly Leu Pro Pro Asp Gly Ile Val Ile Ala Ala
 385 390 395 400
 Leu Val Val Phe Ser Ile Leu Gly Ile Pro Leu Ala Ile Thr Tyr Ser
 405 410 415
 Val Pro Tyr Ala Leu Val Ser Ser Arg Ile Asp Ala Leu Gly Leu Gly
 420 425 430
 Gln Gly Leu Ser Met Gly Val Leu Asn Leu Ala Ile Val Phe Pro Gln
 435 440 445
 Ile Val Val Ser Leu Gly Ser Gly Pro Trp Asp Glu Leu Phe Gly Gly
 450 455 460
 Gly Asn Ser Pro Ala Phe Val Val Ala Ala Leu Ser Ala Phe Ala Gly
 465 470 475 480
 Gly Leu Ile Ala Ile Leu Ala Ile Pro Arg Thr Arg Val Glu Lys Pro
 485 490 495
 Lys Ile Phe Ala
 500

<210> 29
 <211> 1818
 <212> DNA
 <213> Solanum tuberosum

<400> 29
 atggatgcgg tatcgatcag agtaccgtat aagaatctga agcagcagga agtgggaatta 60
 actaatgttg atgaatcacg gtttacacag ttggagatcc gtagtgattc ctcatctcct 120
 agggcttcta atggagaaat gaatgattct catctacctc ttctctctcc gcctgtaacg 180
 aacagtttgc ttaccttgat tcttagttgc accgtcgctg ccggtgttca gtttggatgg 240
 gctttgcaac tatctctcct tacaccttat attcagacac ttggcataga gcatgccttc 300
 tcttctttta tctggctatg cggtcctatt actggccttg tggtaacaacc ttgtgtaggt 360
 atatggagtg ataaatgtca ttctaaatat ggcagaagaa ggcctttcat ttttatttga 420
 gctgtcatga tctctattgc tgtgataatt atcgggtttt ctgctgcaga cataggatac 480
 ttattggggg acacaaaaga gcattgcagc actttcaaag gcaactcgctc aagagcagcc 540
 attgtatttg tcgttggtgt ttggatgctc gatcttgcta ataatactgt gcagggtccg 600
 gctcgagctc ttttggcaga ttgtcaggt cctgatcaaa gaaataccgc aaatgctgtg 660
 ttctgctcct ggatggctgt tggaaacatt cttggatttt ctgctggagc cagtggaggt 720
 tggcacagat ggtttccgtt tttgacaaat agagcttggt gtgagccatg tggaaatctc 780
 aaagcagcat tcttagttgc agtggctttt ctaactctct gcacgttagt aactctctac 840
 ttcgccaatg aagtcccat gtcaccaag caatataaac gcttgtcaga ttctgctcct 900

```

ctcttggata gtcctcagaa tactggcttt gacctttctc aatcaaaaag ggagttgcag 960
tctgtaaata gtgtagcaaa taatgaatct gagatgggtc gtgtagcaga taatagtcca 1020
aagaatgaag aacagagacc tgacaaggat caaggtgata gctttgctga tagccctgga 1080
gcagttttgg tcaatctgtt gaccagctta cgtcatttgc ctcccgcaat gcattcgggt 1140
ctcattgtca tggctctgac ttggttgccc tggtttccct ttttcctttt tgacacggat 1200
tggatgggga gagaagtcta tcatggggac ccgaaaggag aagcagatga agtaaagca 1260
tataaccaag gtgtcagaga aggtgcattt ggtttgctat tgaattctgt tgttcttggc 1320
gtttagctcct ttcttattga gccaatgtgc aagtggattg gttctagact tgtttgggct 1380
gtgagcaact tcattgtatt tgtctgcatg gcctgcaccg ctatcattag cgtgggttcc 1440
atcagtgcac atacggaggg agtccaacat gtgattggtg ctactaaatc aactcaaatt 1500
gctgctttgg ttgttttctc tcttcttggc attcctcttg ctgtaactta cagtgtccct 1560
ttctctatca cagcagagtt gacagctgac gctgggtggtg gtcaagggtt ggcaatagga 1620
gtcctgaatc ttgcaatcgt tttaacctag atgggtgtct cgttgggtgc cgttccatgg 1680
gatgctttat ttgggtggagg aaacataccg gcatttgtct tagcatcttt agctgcactt 1740
gctgctggaa tttttgctat gctcagacta ccaattttat caagtaattt caaatcaact 1800
ggcttccatt ttggttga
1818

```

<210> 30

<211> 605

<212> PRT

<213> Solanum tuberosum

<400> 30

```

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

```

Met Ala Val Gly Asn Ile Leu Gly Phe Ser Ala Gly Ala Ser Gly Gly
 225 230 235 240
 Trp His Arg Trp Phe Pro Phe Leu Thr Asn Arg Ala Cys Cys Glu Pro
 245 250 255
 Cys Gly Asn Leu Lys Ala Ala Phe Leu Val Ala Val Val Phe Leu Thr
 260 265 270
 Leu Cys Thr Leu Val Thr Leu Tyr Phe Ala Asn Glu Val Pro Leu Ser
 275 280 285
 Pro Lys Gln Tyr Lys Arg Leu Ser Asp Ser Ala Pro Leu Leu Asp Ser
 290 295 300
 Pro Gln Asn Thr Gly Phe Asp Leu Ser Gln Ser Lys Arg Glu Leu Gln
 305 310 315 320
 Ser Val Asn Ser Val Ala Asn Asn Glu Ser Glu Met Gly Arg Val Ala
 325 330 335
 Asp Asn Ser Pro Lys Asn Glu Glu Gln Arg Pro Asp Lys Asp Gln Gly
 340 345 350
 Asp Ser Phe Ala Asp Ser Pro Gly Ala Val Leu Val Asn Leu Leu Thr
 355 360 365
 Ser Leu Arg His Leu Pro Pro Ala Met His Ser Val Leu Ile Val Met
 370 375 380
 Ala Leu Thr Trp Leu Pro Trp Phe Pro Phe Phe Leu Phe Asp Thr Asp
 385 390 395 400
 Trp Met Gly Arg Glu Val Tyr His Gly Asp Pro Lys Gly Glu Ala Asp
 405 410 415
 Glu Val Asn Ala Tyr Asn Gln Gly Val Arg Glu Gly Ala Phe Gly Leu
 420 425 430
 Leu Leu Asn Ser Val Val Leu Gly Val Ser Ser Phe Leu Ile Glu Pro
 435 440 445
 Met Cys Lys Trp Ile Gly Ser Arg Leu Val Trp Ala Val Ser Asn Phe
 450 455 460
 Ile Val Phe Val Cys Met Ala Cys Thr Ala Ile Ile Ser Val Val Ser
 465 470 475 480
 Ile Ser Ala His Thr Glu Gly Val Gln His Val Ile Gly Ala Thr Lys
 485 490 495
 Ser Thr Gln Ile Ala Ala Leu Val Val Phe Ser Leu Leu Gly Ile Pro
 500 505 510
 Leu Ala Val Thr Tyr Ser Val Pro Phe Ser Ile Thr Ala Glu Leu Thr
 515 520 525
 Ala Asp Ala Gly Gly Gly Gln Gly Leu Ala Ile Gly Val Leu Asn Leu
 530 535 540
 Ala Ile Val Leu Pro Gln Met Val Val Ser Leu Gly Ala Gly Pro Trp
 545 550 555 560
 Asp Ala Leu Phe Gly Gly Gly Asn Ile Pro Ala Phe Val Leu Ala Ser

19

			565					570				575			
Leu	Ala	Ala	Leu	Ala	Ala	Gly	Ile	Phe	Ala	Met	Leu	Arg	Leu	Pro	Asn
			580					585					590		
Leu	Ser	Ser	Asn	Phe	Lys	Ser	Thr	Gly	Phe	His	Phe	Gly			
		595					600					605			