(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 17 455 T2** 2005.12.29

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 235 904 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 17 455.7**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/31788**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 979 206.0**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 01/036622**
(86) PCT-Anmeldetag: **20.11.2000**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **25.05.2001**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **04.09.2002**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **12.01.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **29.12.2005**

(51) Int Cl.[7]: **C12N 15/00**

(30) Unionspriorität:
166268 P **18.11.1999** **US**

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

(73) Patentinhaber:
E.I. du Pont de Nemours and Co., Wilmington, Del., US

(72) Erfinder:
CAIMI, G., Perry, Kennett Square, US; LIGHTNER, Jonathan, Mulino, US

(74) Vertreter:
derzeit kein Vertreter bestellt

(54) Bezeichnung: **FRUKTOSEPOLYMER SYNTHESE IN PLASTIDEN MONOKOTYLER PLANZEN**

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

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

Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verfahren zur Synthese und Akkumulation von Fructooligosacchariden (FOS) in Monocotyledonen. Gegenstand der Erfindung ist auch die Beschreibung des Targeting von Fructosyltransferase-Enzymen (FTF) auf das Plastid, resultierend in einem Gemisch aus Stärke und FOS, die funktionelle Eigenschaften aufweisen, die sich im Vergleich zu Stärke des Wildtyps (Dent) deutlich unterscheiden.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Höhere Pflanzen akkumulieren gewerblich nützliche Kohlenhydrat-Polymere, wie zum Beispiel Cellulose, Stärke und FOS. Stärke und Cellulose können in ihrer nativen Form nützlich sein, sind aber viel wahrscheinlicher enzymatisch oder chemisch modifiziert, wodurch ihr Wert sehr weitgehend gesteigert wird.

[0003] FOS ist ein lineares oder verzweigtes Polymer aus sich wiederholenden Fructoseresten. Von der Quelle abhängig, variiert die Anzahl der Reste in einem einzelnen Polymer (Science and Technology of Fructans (1993), M. Suzuki und N. Chatterton, Hrsg. CRC Press Inc., Boca Raton, FL, S. 169 – 190). FOS ist ein idealer Zusatzstoff zum Gebrauch in einer großen Reihe verschiedener kalorienfreier Lebensmittelprodukte, weil Menschen FOS nicht metabolisieren können und Polymere mit drei bis vier Fructoseresten mit einem Polymerisationsgrad von DP 3 – 4 relativ süß sind. Polymere mit hohem DP (> DP 4) sind nicht süß, sie können jedoch für die Lebensmittelprodukte eine Textur bereitstellen, die der des Fettes sehr ähnlich ist. Als Fettersatz verwendetes Fructooligosaccharid mit hohem Polymerisationsgrad (DP) trägt nicht nennenswert zum Kalorienwert des Produktes bei. Fructooligosaccharid wird auch als eine ausgezeichnete Fructosequelle zur Herstellung eines Sirups mit hohem Fructosegehalt erachtet (Fuchs, A. (1993) in Science and Technology of Fructans, M. Suzuki und N. Chatteron, Hrsg, CRC Press Inc., Boca Raton, FL, S. 319 – 352). Eine einfache Hydrolyse von FOS in einzelne Fructosereste besäße einen enormen Vorteil gegenüber dem aktuellen, technisch aufwendigen Verfahren zur enzymatischen Umwandlung von Stärke in einen Sirup mit hohem Fructosegehalt. Folglich könnte die Verwendung von FOS als das Ausgangsmaterial die Herstellungskosten für Fructose signifikant reduzieren.

[0004] Der gewerbliche Wert für FOS ist potenziell hoch, seine Verwendung ist jedoch aufgrund seiner hohen Herstellungskosten stark eingeschränkt. Fructooligosaccharide zur Verwendung in hochwertigen, kalorienarmen Lebensmitteln werden in der Regel mithilfe einer teuren Fermentationskultur-Technologie hergestellt. Die Isolierung aus Pflanzen würde die Herstellungskosten reduzieren, FOS wird jedoch in vielen Nutzpflanzen von landwirtschaftlicher Bedeutung nicht gefunden. Herkömmliche Nutzpflanzen, die für breite Wuchsgebiete, wie zum Beispiel Hafer, Weizen und Gerste, angepasst sind, akkumulieren FOS, aber nur in extrem kleinen Konzentrationen. Fructooligosaccharid wird derzeit aus Pflanzen in einem relativ kleinen gewerblichen Maßstab und nur aus einer einzelnen Pflanzenspezies, Cichorium intybus, geerntet.

[0005] Transgene Versionen wichtiger Nutzpflanzen, die FOS durch Expression von chimären FTF-Genen akkumulieren, würden einen signifikanten Vorteil gegenüber nativen FOS-speichernden Pflanzen bieten, wobei Gebrauch von etablierten Züchtungsprogrammen, Schädlingsresistenz und Anpassung an eine breite Reihe verschiedener Wuchsgebiete überall auf der Welt gemacht wird. Beispiele der FOS-Synthese in transgenen Pflanzen, die Gene von Bakterienspezies, wie zum Beispiel Bacillus, Streptococcus und Erwinia, enthalten, wurden berichtet (Caimi et al. (1996), Plant Physiol. 110: 355 – 363; Ebskamp et al. (1994), Biotechnol. 12: 272 – 275; Robert et al. (1996), Planta 199: 528 – 536).

[0006] Es wurde gezeigt, dass das Richten der Polymersynthese auf spezifische Zellkompartimente für die normale Pflanzenentwicklung kritisch ist (Caimi et al., (1996) Plant Physiol. 110: 355 – 363). Das Targetieren eines chimären FTF auf das Cytosol kann für die Zellentwicklung extrem nachteilig sein, wohingegen gezeigt wurde, dass die FOS-Synthese in der Zellvakuole für das Gewebe weniger nachteilig ist, es wurden jedoch sehr niedrige Konzentrationen der FOS-Akkumulation berichtet (Ebskamp et al., (1994) Biotechnol. 12: 272 – 275). Die Manipulation erhöhter FOS-Konzentrationen in transgenen Pflanzen, wobei die FOS-Synthese auf spezifische Zellkompartimente targetiert wird, würde sich minimal auf die Zellentwicklung auswirken und eine erhöhte Effizienz bei der Isolierung und Reinigung des Produktes zulassen. Dies würde wiederum zu reduzierten Herstellungskosten führen.

[0007] Das Richten der FOS-Synthese auf Plastide könnte auch eine Gelegenheit zum Mischen von FOS-

und Stärkesynthese zur Herstellung von Stärkemischungen bereitstellen. Stärke ist ein Gemisch aus zwei Polysacchariden, Amylose und Amylopectin. Amylose stellt eine unverzweigte Kette aus bis zu mehreren Tausend α-D-Glucopyranose-Einheiten dar, die durch α-1,4-glycosidische Bindungen verknüpft sind. Amylopectin ist ein hoch verzweigtes Molekül, das aus bis zu 50 000 α-D-Glucopyranoseresten aufgebaut ist, die durch α-1,4- und α-1,6-glycosidische Bindungen verknüpft sind. Ca. 5% der glycosidischen Verknüpfungen in Amylopectin sind α-1,6-Bindungen, die zur verzweigten Struktur des Polymers führen.

[0008] Funktionelle Eigenschaften, wie zum Beispiel Viskosität und Stabilität einer verkleisterten Stärke bestimmen die Nützlichkeit und somit den Wert der Stärke in Lebensmittel- und Industrie-Applikationen. Wenn eine spezifische funktionelle Eigenschaft benötigt wird, könnten Stärken, die aus verschiedenen Nutzpflanzen, wie zum Beispiel Mais, Reis oder Kartoffeln gewonnen werden, den Anforderungen an die Funktionalität entsprechen. Wenn eine Stärke einer geforderten funktionellen Eigenschaft nicht entspricht, kann die Funktionalität manchmal durch chemische Modifikation der Stärke erreicht werden. In der Stärkeindustrie werden verschiedene Typen und Grade der chemischen Modifikation verwendet, und die Verwendung chemisch modifizierter Stärken wird in den USA durch die Food and Drug Administration (FDA) reguliert. „Lebensmittel-modifizierte" Stärken können in Lebensmitteln verwendet werden, müssen aber spezifizierten Behandlungsgrenzwerten entsprechen, und „industrielle Stärke-modifizierte" Stärken können in Gegenständen, wie zum Beispiel Behältnissen verwendet werden, die mit Lebensmitteln in Kontakt kommen und müssen auch den spezifizierten Behandlungsanforderungen entsprechen; Code of Federal Regulations, Title 21, Chapter 1, Part 172, Food Additives Permitted in Food for Human Consumption, Section 172, 892, Food Starch-Modified, U.S. Government Printing Office, Washington, DC, 1981; (a) Paragraph 178, Indirekte Lebensmittel-Zusatzstoffe, Abschnitt 178.3520, Industriell Stärkemodifiziert. Diese Regulationen grenzen den Grad der chemischen Modifikationsmittel durch Definition der maximalen Menge des chemischen Reagenzes ein, das in den Modifikationsschritten verwendet werden kann. Die Konzentrationen von Nebenprodukten in Stärke, die aus dem Modifikationsverfahren resultieren, sind auch reguliert. Für Propylenchlorhydrin-Reste in Hydroxypropylstärke bestehen zum Beispiel spezielle Bedenken; Tuschhoff, J. V., (1986) Hydroxypropylated Starches, In Modified Starches: Properties and Uses, O. B. Wurzbwg, Hrsg., CRC Press, Boca Raton, FL, S. 55 – 57. Die Herbeiführung von Funktionalität mithilfe von Mitteln, mit Ausnahme von chemischer Modifikation, würde Bedenken in Bezug auf chemische „Rückstände", die in diesen regulierten Stärkeprodukten zurückbleiben, eliminieren.

[0009] Die physikalischen Eigenschaften unmodifizierter Stärke während des Erhitzens und Abkühlens schränken seine Nützlichkeit in vielen Applikationen ein. Aufgrund dessen sind erhebliche Bemühungen und Kosten zur chemischen Modifikation von Stärke erforderlich, um diesen Einschränkungen zu begegnen und die Nützlichkeit von Stärke auf industrielle Applikationen zu erweitern. Einige Einschränkungen unmodifizierter Stärken und Eigenschaften modifizierter Stärken sind in Modified Starches: Properties and Uses, O. B. Wurzburg, Hrsg. (1986), CRC Press Inc., Boca Raton, FL, aufgelistet.

[0010] Chemische Modifikationen werden oft zur Stabilisation von Stärkekörnchen verwendet, wobei sie die Stärke für Tausende von Lebensmittel- und Industrie-Applikationen, einschließlich Säuglingsnahrung. Kaffeemilchpulver, chirurgischer Streupuder, Papierleime und Garnschlichten und Klebstoffen geeignet machen. Zu allgemeinen chemischen Modifikationen gehören die Vernetzung, wobei chemische Bindungen eingeführt werden, um als stabilisierende Brücken zwischen Stärkemolekülen zu wirken, und Substitution, wobei die Substituentengruppen, wie zum Beispiel Hydroxyethyl-, Hydroxypropyl- oder Acetylgruppen, in Stärkemoleküle eingeführt werden.

[0011] Substituentengruppen an Stärkemolekülen greifen störend in die Inter- und Intrakettenanziehung zwischen Hydroxylgruppen ein. Verfahren, die diese Kettenassoziation ändern, wirken sich signifikant auf die Stärkeeigenschaften aus (Orthoefer, F. T. (1987) in Corn: Chemistry and Technology, S. A. Watson und P. E. Ramstad, Hrsg., American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, MN, S. 479 – 499) aus. Hydroxypropylierte Stärken, als ein Beispiel, werden aufgrund ihrer verbesserten Viskositätsstabilität und Wasserhaltekapazität unter Lagerungsbedingungen bei niedriger Temperatur in der Lebensmittelindustrie verbreitet verwendet (Rutenberg, M. W. und Solarek, D. (1984), Starch Derivatives in Starch R. L. Whistler, J. N. BeMiller und E. F. Paschall, Hrsg, Academic Press, Inc., Orlando FL, S. 312 – 366).

[0012] Das Targeting eines FTF auf Plastide resultiert in einem Stärke/FOS-Gemisch, das die Stärkestruktur und -funktionalität verändern kann. Targeting eines FTF auf Plastide wurde berichtet (Turk et al. WO 97/29186). Turk et al. (WO 97/29186) teilen jedoch nicht die FOS-Konzentration in transgenen Pflanzen mit. Die Expression in nur transgenen dicotyledonen (dicotylen) Pflanzen wird beschrieben, und eine spezifische Modifikation von Stärkefunktionseigenschaften wird nicht nachgewiesen.

[0013] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist u. a. ein Verfahren zur Synthese großer FOS-Mengen in transgenen monocotyledonen Pflanzen, enthaltend einen Endosperm-spezifischen Promotor, der auf die Expression eines Plastid-targetierten FTF-Gens gerichtet ist. Es wird zum Beispiel gezeigt, dass das Targeting dieses Enzyms auf Plastide in Mais-Endosperm die physikalischen und funktionellen Eigenschaften von Maisstärke verändert. Hierbei handelt es sich um das erste Beispiel einer veränderten Stärkefunktionalität in einer monocotyledonen (monocotylen) Pflanze durch Akkumulieren eines alternativen Polymers im Körnchen.

[0014] Es sind zahlreiche Unterschiede zwischen monocotyledonen und dicotyledonen (dicotylen) Pflanzen bekannt, die die praktische Applikation von Techniken, Manipulationen oder Verfahren für eine Pflanzengruppe anwendbar für die andere jedoch nicht anwendbar machen. Dies trifft besonders zu, wenn man die Unterschiede im Kohlenhydratprofil im Speichergewebe unter unähnlichen Pflanzen betrachtet.

[0015] Gut dokumentierte Unterschiede zwischen aus Mono- und Dicotyledonen isolierten Stärken wurden im Verlauf der Geschichte seit langem genutzt. Der Funktionsunterschied zwischen Kartoffel- und Maisstärken oder zwischen Reis- und Tapiokastärken sind nur zwei Beispiele. Diese signifikanten Unterschiede werden in der Stärkeindustrie gut erkannt, wie durch das Vorhandensein von Absatzmärkten für Stärken aus einer Reihe verschiedener Pflanzenspezies belegt werden kann.

[0016] Die Stärkesynthese in Speichergeweben von Cerealien und Nichtcerealien hängt von verschiedenen metabolischen Präkursortypen ab. Im Gegensatz zur Stärkesynthese in Cerealien-Amyloplasten importieren Speicherplastide aus vielen Pflanzen Hexosephosphate (Mohlmann et al., (1997) Biochem. J. 324: 503 – 509). So transportiert zum Beispiel die Erbse (Pisum sativum L.), eine Dicotyledone, Glucose-6-phosphat in Amyloplasten, den Ort, an dem Stärke synthetisiert und gespeichert wird. In Monocotyledonen, wie zum Beispiel Mais, wird ADP-Glucose in den Amyloplast transportiert (Denyer et al., (1996) Plant Phys. 112:779 – 785). Hiermit wird der grundlegende Unterschied der Stoffwechselwege erläutert, die zum Processing verschiedener in Plastide transportierter Kohlenhydratformen notwendig sind.

[0017] Basierend auf diesen Berichten wird deutlich, dass hinsichtlich des Kohlenhydratgehalts von Monocotyledonen und Dicotyledonen signifikante Unterschiede vorliegen. Saccharose ist das einzige Substrat, das von FTF bei der Synthese von FOS genutzt wird. Das Vorliegen von Saccharose in den Plastiden von Monocotyledonen-Zellen (z. B. Mais-Endospermzellen) wurde, soweit dem Anmelder bekannt ist, noch nicht berichtet. Die Saccharose-Konzentration ist für die FOS-Synthese auch kritisch, und wiederum sind dem Anmelder keine Berichte über eine Saccharose-Konzentration in Monocotyledonen-Plastiden bekannt. Deshalb war vor der vorliegenden Erfindung eine Prädiktion, ob Substrat zur Synthese von FOS in Monocotyledonen-Plastiden zur Verfügung steht, nicht möglich. Überdies hätte das Targeting eines FTF auf Plastide in verschiedenen Pflanzenspezies vor der vorliegenden Erfindung in Bezug auf die FOS-Synthese überdies zu unerwarteten Ergebnissen geführt.

[0018] Während nicht beabsichtigt ist, an eine bestimmte Theorie oder bestimmte Theorien des Vorgangs gebunden zu sein, besteht die Annahme, dass es sich bei der Verfügbarkeit von Saccharose in einer transgenen Pflanzen um eine kritische Komponente der FOS-Synthese handelt. Der Saccharose-Transport und -Metabolismus unterscheidet sich unter Pflanzenspezies erheblich. Spezialisierte Zellen (Transfer-Zellen im basalen Endosperm oder BET-Zellen) werden zum Transport und Metabolismus von Saccharose in sich entwickelnden Mais-, Weizen- und Gerstekörnern angepasst (Olsen et al. (1999), Trend in Plant Sci. 4: 253 – 257. Es wird angenommen, dass der größte Teil (mehr als 90%) der an Maiskörner transportierten Saccharose in der BET-Schicht hydrolysiert wird (Shannon, J. (1972) Plant Physiol. 49: 198 – 202). Die resultierenden Hexose-Zucker werden an die sich entwickelnden Endosperm-Zellen transportiert und vor Eintritt in den biosynthetischen Stoffwechselweg der Stärke als Saccharose resynthetisiert. Diese spezialisierten Transfer-Zellen sind unter den Dicotyledonen-Spezies nicht bekannt. Im Gegensatz zu Mais wird Saccharose direkt an die Knollenzellen der Kartoffel (eine Dicotyledone) transportiert, wo sie in nicht modifizierter Form in den biosynthetischen Stoffwechselweg der Stärke eintritt (Oparka, K, und Wright, K. (1988) Planta 174: 123 – 126). Variationen der Saccharose-Konzentration sind deshalb, abhängig von der Pflanzenspezies, im Speichergewebe zu erwarten.

[0019] Die Stärkesynthese in Speichergeweben von Cerealien und Nichtcerealien hängt von verschiedenen metabolischen Präkursortypen ab. Im Gegensatz zur Stärkesynthese in Ceralien-Amyloplasten importieren die Speicher-Plastide aus vielen Pflanzen Hexosephosphate (Mohlmann et al. (1977), Biochem. J. 324: 503 – 509). So transportiert zum Beispiel die Erbse (Pisum sativum L.), eine Dicotyledone, Glucose-6-phosphat in Amyloplasten, an den Ort, an dem Stärke synthetisiert und gespeichert wird. In Monocotyledonen, wie zum Beispiel Mais, wird die ADP-Glucose in den Amyloplast transportiert (Denyer et al. (1996), Plant Phys. 112: 779 – 785). Hiermit wird der grundlegende Unterschied der Stoffwechselwege erläutert, die zum Processing ver-

schiedener in die Plastide transportierter Kohlenhydratformen notwendig sind.

[0020] Basierend auf diesen Berichten wird deutlich, dass hinsichtlich des Kohlenhydratgehalts von Monocotyledonen und Dicotyledonen signifikante Unterschiede vorliegen. Saccharose ist das einzige Substrat, das von FTF bei der Synthese von FOS genutzt wird. Das Vorliegen von Saccharose im Plastid der Mais-Endospermzelle wurde, soweit dem Anmelder bekannt ist, noch nicht berichtet. Die Saccharose-Konzentration ist für die FOS-Synthese auch kritisch, und wiederum sind dem Anmelder keine Berichte über eine Saccharose-Konzentration in Endosperm-Plastiden von Mais bekannt. Deshalb war vor der vorliegenden Erfindung eine Prädiktion, ob Substrat zur Synthese von FOS in Mais-Plastiden zur Verfügung steht, nicht möglich. Überdies hätte das Targeting eines FTF auf Plastide in verschiedenen Pflanzenspezies vor der vorliegenden Erfindung in Bezug auf die FOS-Synthese zu unerwarteten Ergebnissen geführt.

[0021] Während nicht beabsichtigt ist, an irgendeine bestimmte Theorie oder bestimmte Theorien des Vorgangs gebunden zu sein, besteht die Annahme, dass es sich bei der Verfügbarkeit von Saccharose in einer transgenen Pflanze um eine kritische Komponente der FOS-Synthese handelt. Der Saccharose-Transport und -Metabolismus unterscheidet sich unter Pflanzenspezies erheblich. Spezialisierte Zellen (Transfer-Zellen des basalen Endosperms oder BET-Zellen) werden zum Transport und Metabolismus von Saccharose in Maiskörnern angepasst. Es wird angenommen, dass der größte Teil (höher als 90%) der an Maiskörner transportierten Saccharose in der BET-Schicht hydrolysiert wird (Shannon, J. (1972), Plant Physiol. 49: 198 – 202). Die resultierenden Hexose-Zucker werden an die sich entwickelnden Endosperm-Zellen transportiert und vor dem Eintritt der Stärke in den biosynthetischen Stoffwechselweg der Stärke als Saccharose resynthetisiert. Diese spezialisierten Transfer-Zellen wurden nicht in Dicotyledonen-Spezies gefunden. Im Gegensatz zu Mais wird Saccharose direkt an die Knollenzellen von Kartoffeln (eine Dicotyledone) transportiert, wo sie in nicht modifizierter Form in den biosynthetischen Stoffwechselweg der Stärke eintritt (Oparka, K. und Wright, K. (1988) Planta 174: 123 – 126). Variationen der Saccharose-Konzentration sind deshalb, abhängig von der Pflanzenspezies, im Speichergewebe zu erwarten.

[0022] Obwohl manchmal unzureichend verstanden, ist die Nutzung der Unterschiede zwischen monocotyledonen und dicotyledonen Pflanzen nicht als neues Konzept zu verstehen. Diese Unterschiede sind die treibende Kraft hinter der Kommerzialisierung von Herbiziden. Ein Beispiel stellt das Herbizid 2-4-D dar, das für Dicotyledonen äußerst toxisch ist, aber wenig oder keine Wirkung auf die Monocotyledonen-Spezies aufweist.

[0023] Variationen der Kohlenhydrat-Konzentration, des Transports und Metabolismus unter Pflanzenspezies, besonders zwischen Monocotyledonen und Dicotyledonen, sind ganz eindeutig mit zu vielen Folgen verbunden, um unüberlegte Generalisierungen zuzulassen. Diese wenigen, aber signifikanten Beispiele deuten eindeutig auf die nutzlose Natur von Prädiktionen in Bezug auf den Erfolg der FOS-Synthese oder der Veränderung der Stärke-Funktionalität im Plastid einer Monocotyledone basierend auf verschiedenen Berichten über Untersuchungen an Dicotyledonen hin.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0024] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung erhöhter Fructose-Polymermengen und einer Stärke/Fructooligosaccharid-Mischung durch Expression einer Plastid-targetierten Fructosyltransferase-Gensequenz in transgenen Monocotyledonen-Spezies. Gegenstand der Erfindung ist auch ein rekombinantes DNA-Konstrukt, umfassend einen gewebespezifischen Promotor, der funktionsfähig mit einem Plastid-Targeting-Signal verknüpft ist, das funktionsfähig mit einer Kodiersequenz für ein Fructosyltransferase-Gen (zum Beispiel EC 2.4.1.10) dergestalt verknüpft ist, dass das Konstrukt zum Transformieren einer Monocotyledonen-Zelle fähig ist, was in der Produktion von Fructooligosaccharid in einem Plastid resultiert. Gegenstand der Erfindung sind weiter die veränderten physikalischen und funktionellen Eigenschaften eines Gemischs aus Stärke und Fructooligosaccharid im aus der Maispflanzenzelle isolierten Körnchen. Gegenstand der Erfindung ist weiter ein Verfahren zur Herstellung eines Fructooligosaccharid/Stärke-Gemischs, umfassend das Ziehen einer transgenen monocotyledonen Pflanze (in der ein Plastid-targetiertes Fructosyltransferase-Gen enthalten ist), Ernten der Pflanze und Extrahieren des Fructooligosaccharid/Stärke-Gemischs aus der geernteten Pflanze. Das Stärke- und Fructooligosaccharid-Gemisch oder die -Mischung verweist auf das Vermischen von Stärke und Fructooligosaccharid miteinander. Die Polymere können kovalent oder sonst wie verknüpft sein. Die Polymere können sich untereinander umgeben oder vollkommen verknäult sein, und diese Assoziation verändert die funktionellen Eigenschaften im Vergleich zu aus nicht transformierten Pflanzen isolierter Stärke.

[0025] Gegenstand der Erfindung ist ein Konstrukt, umfassend ein isoliertes und/oder gereinigtes FTF-Gen

ebenso wie veränderte Versionen davon. Veränderungen können die Aktivität der Fructosyltransferase auf eine derartige Weise beeinflussen, dass zum Beispiel der Polymerisationsgrad oder die Struktur des hergestellten Fructooligosaccharids verändert ist. Es kann/können erfindungsgemäß weiter eine einzelne Fructosyltransferase-Gensequenz oder eine Kombination von Fructosyltransferase-Gensequenzen verwendet werden.

[0026] Die wie erfindungsgemäß beschriebene induzierte Akkumulation von Fructooligosaccharid in transgenen Pflanzen erlaubt die Extraktion von Fructooligosaccharid aus diesen Pflanzen zum Zweck der Fructooligosaccharid-Herstellung. Fructooligosaccharid kann sich in diesen Pflanzen in erntefähigen Organen, wie zum Beispiel Wurzeln, Blättern, Stengeln und Samen akkumulieren. Gegenstand der Erfindung sind weiter Samen, Ableger oder andere Teile der transgenen Pflanzen, die zur kontinuierlichen Herbeiführung weiterer Generationen der Pflanzen nützlich sind.

[0027] Genetisch modifizierte Nutzpflanzen, die die vorstehenden Fructosyltransferase-kodierenden Konstrukte inkorporieren, lassen die effiziente Herstellung qualitätsmäßig hochwertiger Kohlenhydrat-Polymere zu.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN UND SEQUENZ-BESCHREIBUNGEN

[0028] Die Erfindung ist anhand der folgenden ausführlichen Beschreibung und der beiliegenden Zeichnungen und Sequenzbeschreibungen, die einen Teil dieser Anmeldung bilden, besser verständlich.

[0029] Fig. 1 ist eine schematische Darstellung des Konstrukts (10 kD-CTS-Sac), das zum Exprimieren des Plastid-targetierten SacB-Gens im Mais-Endosperm verwendet wird. Das Chloroplast-Transit-Signal wurde, im Rahmen, an die mature Kodiersequenz des SacB-Gens fusioniert.

[0030] Fig. 2 ist eine grafische Darstellung der Konzentration von FOS, das aus zehn unabhängigen transformierten Maislinien, enthaltend das 10 kD-CTS-Sac-Konstrukt, isoliert wurde. Zehn mature Samen wurden getrennt auf die FOS-Konzentration bestimmt, worauf der Durchschnitt für jede unabhängige transgene Linie ermittelt wurde. Das Diagramm stellt die durchschnittliche FOS-Konzentration in mg pro Samen dar.

[0031] Fig. 3 stellt eine DC-Platte dar, die die Anwesenheit von FOS in zwei separaten transgenen Linien zeigt. Der EtOH-Extrakt (3 µl) wurde zusätzlich zum Wasserextrakt des Pellets (3 µl) auf eine DC-Platte getüpfelt. Das positive Signal am Startfleck der Platte lässt erkennen, dass das in den Samen akkumulierte FOS von hohem Molekulargewicht ist. Lösliche Zucker (Saccharose und Fructose) sind zusätzlich zu einer kleinen FOS-Menge in der Nähe der Lösungsmitteifront in den EtOH-Extrakten anwesend.

[0032] Fig. 4 ist eine Rasterelektronen-Mikrofotografie von aus Samen isolierten Stärkekörnchen, enthaltend das 10 kD-CTS-Sac-Konstrukt.

[0033] Fig. 5 stellt einen Vergleich der Molekulargewichtsverteilung von Stärke aus Samen mit dem oder ohne das 10 kD-CTS-Sac-Konstrukt dar. Eine Zunahme des Kohlenhydrats mit hohem Molekulargewicht wird anhand der Probe XBG02118-5 nachgewiesen.

[0034] Fig. 6 zeigt Wasserextrakte (3 µl) von isolierten Stärkekörnchen, die auf eine DC-Platte aufgetüpfelt wurden. Die Körnchen wurden aus einzelnen Samen isoliert, die auf das 10 kD-CTS-Sac-Konstrukt segregiert wurden. Ein positives Signal ist am Startfleck der Platte in den Proben S1, S2 und S3 aus zwei unabhängigen Linien (XBG02045 und XBG02118) vorhanden.

[0035] Fig. 7 zeigt die RVA-Analyse aus Dent- und transgenen Linien, enthaltend das 10 kD-CTS-Sac-Konstrukt (XAW00361 und XAW00363). Die Peak-Viskosität, Verkleisterungstemperatw und das Einsetzen des Verkleisterns sind in den transgenen Linien im Vergleich zur nativen Dent-Stärke alle verändert.

[0036] SEQ ID NO:1 ist eine partielle Nukleotidsequenz, die das Chloroplast-Transit-Signal der kleinen Untereinheit RuBP-Carboxylase von Mais (Zea mays L.) darstellt.

[0037] SEQ ID NO:2 ist eine partielle Aminosäuresequenz, die das durch SEQ ID NO:1 kodierte Chloroplast-Transit-Signal der kleinen Untereinheit RuBP-Carboxylase von Mais (Zea mays L.) darstellt.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG – DEFINITIONEN

[0038] Im Rahmen dieser Offenbarung sollen eine Anzahl von Begriffen verwendet werden. Wie hierin verwendet, verweist der Begriff „Nukleinsäure" auf ein Polymer der RNA oder DNA, die ein- oder doppelsträngig ist, die gegebenenfalls synthetische, nicht natürliche oder veränderte Nukleotidbasen enthält. Ein „Nukleinsäurefragment" ist eine Fraktion eines bestimmten Nukleinsäuremoleküls. In höheren Pflanzen stellt die Desoxyribonukleinsäure (DNA) das genetische Material dar, während die Ribonukleinsäure (RNA) an der Weiterleitung der Information in der DNA in Proteine beteiligt ist. Ein Nukleinsäurefragment in der Form eines DNA-Polymers kann aus einem oder mehr Segment(en) der cDNA, genomischen DNA, synthetischen DNA oder Gemischen davon bestehen.

[0039] Ein „Genom" ist der gesamte Körper des in jeder Zelle eines Organismus enthaltenen genetischen Materials. Der Begriff „Nukleotidsequenz" verweist auf ein DNA- oder RNA-Polymer, das ein- oder doppelsträngig sein kann und gegebenenfalls synthetische, nicht natürliche oder veränderte Nukleotidbasen enthält, die zur Inkorporation in DNA- oder RNA-Polymere fähig sind.

[0040] „Gen" verweist auf ein Nukleinsäurefragment, das ein spezifisches Protein, einschließlich Regulationssequenzen enthält, die der Kodiersequenz (5' nicht kodierende Sequenzen) vorangehen und (3' nicht kodierende Sequenzen) folgen. „Natives Gen" verweist auf ein Gen, wie es mit seinen eigenen Regulationssequenzen natürlich vorkommt. „Chimäres Gen" verweist auf jedwedes Gen, das kein natives Gen ist, umfassend Regulations- und Kodiersequenzen, die in der Natur nicht zusammen zu finden sind. Demgemäß kann ein chimäres Gen Regulations- und Kodiersequenzen umfassen, die sich aus verschiedenen Quellen herleiten, oder Regulationssequenzen und Kodiersequenzen, die sich aus der gleichen Quelle herleiten, aber auf eine Weise angeordnet sind, die sich von den natürlich vorkommenden unterscheidet. „Endogenes Gen" verweist auf ein natives Gen in seiner natürlichen Lokalion im Genom eines Organismus. Ein „Fremd"-Gen verweist auf ein Gen, das in der Regel nicht im Wirtsorganismus zu finden ist, das aber mittels Gentransfer in den Wirtsorganismus eingeführt wird. Fremd-Gene können in einen nicht nativen Organismus insertierte native Gene oder chimäre Gene umfassen. Ein „Transgen" ist ein Gen, das durch ein Transformationsverfahren in das Genom eingeführt wird.

[0041] „Kodiersequenz" verweist auf eine Nukleotidsequenz, die für eine spezifische Aminosäuresequenz kodiert, oder mindestens einen Anteil davon, der eine Aminosäuresequenz bereitstellt, die im Wesentlichen auf die gleiche Weise wie die Aminosäuresequenz voller Länge funktioniert. „Regulationssequenzen" verweisen auf Nukleotidsequenzen, die darin vorgeschaltet (5' nicht kodierende Sequenzen) oder nachgeschaltet (3' nicht kodierende Sequenzen) einer Kodiersequenz lokalisiert sind und die die Transkription, RNA-Processing oder -Stabilität oder die Translation der assoziierten Kodiersequenz beeinflussen. Regulationssequenzen können Promotoren, Translations-Leader-Sequenzen, Introne und Polyadenylierungs-Erkennungssequenzen einschließen.

[0042] „Initiationscodon" und „Terminationscodon" verweisen auf eine Einheit aus drei nachbarständigen Nukleotiden in einer Kodiersequenz, die Initialion bzw. Kettentermination der Proteinsynthese (mRNA-Translation) spezifiziert. „Open Reading Frame" verweist auf die Aminosäuresequenz, die zwischen den Translationsinitiations- und Terminationscodonen einer Kodiersequenz kodiert ist.

[0043] Wie hierin verwendet, verweisen geeignete „Regulationssequenzen" auf Nukleotidsequenzen, die sich vorgeschaltet (5') in und/oder nachgeschaltet (3') an einer Kodiersequenz befinden, die die Transkription und/oder Expression der Kodiersequenzen kontrollieren. Diese Regulationssequenzen schließen Promotoren, Translations-Leader-Sequenzen, Transkriptions-Terminationssequenzen und Polyadenylierungs-Sequenzen ein. In artifiziellen DNA-Konstrukten können die Regulationssequenzen auch die Transkription und Stabilität der Antisense-RNA kontrollieren.

[0044] „Promotor" verweist auf eine Nukleotidsequenz, die zur Kontrolle der Expression einer Kodiersequenz oder funktionellen RNA fähig ist. Im Allgemeinen befindet sich eine Kodiersequenz 3' an einer Promotor-Sequenz. Die Promotor-Sequenz besteht aus proximalen und distaleren vorgeschalteten Elementen, wobei auf die letzteren Elemente oft als auf Enhancer verwiesen wird. Demgemäß stellt ein „Enhancer" eine Nukleotidsequenz dar, die die Promotor-Aktivität stimulieren kann und ein natürliches Element des Promotors oder eines heterologen Elements sein kann, das zum Enhancement des Spiegels oder der Gewebespezifität eines Promotors insertiert wird. Promotoren können sich gänzlich von einem nativen Gen herleiten oder sich aus verschiedenen Elementen zusammensetzen, die sich von verschiedenen natürlich vorkommenden Promotoren herleiten oder sogar synthetische Nukleotidsegmente umfassen. Es wird vom Durchschnittsfachmann erkannt

werden, dass verschiedene Promotoren die Expression eines Gens in verschiedenen Geweben oder Zelltypen oder auf verschiedenen Entwicklungsstufen oder als Antwort auf verschiedene Umweltbedingungen richten können. Auf Promotoren, die die Expression eines Nukleinsäurefragments in den meisten Zelltypen zu den meisten Zeitpunkten veranlassen können, wird im Allgemeinen als auf „konstitutive Promotoren" verwiesen. „Gewebespezifische" oder „entwicklungssepzifische" Promotoren, auf die hierin verwiesen wird, sind diejenigen, die die Genexpression fast ausschließlich in spezifischen Geweben, wie zum Beispiel Blättern oder Samen, oder auf spezifischen Entwicklungsstufen in einem Gewebe, wie zum Beispiel in der frühen bzw. späten Embryogenese, richten. Neue Promotoren verschiedener Typen sind in Pflanzenzellen nützlich, die ständig entdeckt werden; zahlreiche Beispiele sind in der Zusammenstellung von Okamuro und Goldberg (1989), Biochemistry of Plants 15: 1 – 82, zu finden. Da in den meisten Fällen die genauen Grenzen der Regulationssequenzen nicht vollständig definiert wurden, wird weiter erkannt werden, dass Nukleinsäurefragmente verschiedener Längen eine identische Promotor-Aktivität aufweisen können.

[0045] „RNA-Transkript" verweist auf das Produkt, das aus der RNA-Polymerase-katalysierten Transkription einer DNA-Sequenz entsteht. Wenn das RNA-Transkript eine perfekte komplementäre Kopie der DNA-Sequenz darstellt, wird darauf als das primäre Transkript verwiesen, oder es kann eine RNA-Sequenz sein, die sich aus dem posttranskriptionalen Processing des primären Transkripts herleitet und worauf als auf die mature RNA verwiesen wird, „Messenger-RNA (mRNA)" verweist auf die RNA, das heißt ohne Introne und die durch die Zelle in ein Polypeptid translatiert werden kann. „cDNA" verweist auf eine doppelsträngige DNA, die komplementär zur mRNA ist und sich von der mRNA herleitet. „Sense"-RNA verweist auf ein RNA-Transkript, das die mRNA einschließt und auf diese Weise durch die Zelle in ein Polypeptid translatiert werden kann. „Antisense-RNA" verweist auf ein RNA-Transkript, das zum gesamten oder zu einem Teil eines primären Target-Transkripts oder einer mRNA komplementär ist und das die Expression eines Target-Gens blockiert (siehe US-Patent Nr. 5,107,065). Die Komplementarität eines Antisense-RNA kann mit jedwedem Teil der spezifischen Nukleotidsequenz, d. h. an der 5' nicht kodierenden Sequenz, 3' nicht kodierenden Sequenz, den Intronen, oder der Kodiersequenz erfolgen. „Funktionelle RNA" verweist auf Sense-RNA, Antisense-RNA, Ribozym-RNA oder andere RNA, die nicht translatiert sein könnte, aber dennoch einen Effekt auf die Zellvorgänge aufweist.

[0046] Der Begriff „funktionsfähig verknüpft" verweist auf die Assoziation von zwei oder mehr Nukleinsäurefragmenten an einem einzelnen Nukleinsäurefragment, so dass die Funktion des einen sich auf die Funktion des anderen auswirkt. Ein Promotor wird zum Beispiel funktionsfähig mit einer Kodiersequenz verknüpft, wobei er fähig ist, die Expression dieser Kodiersequenz zu beeinflussen (d. h. dass sich die Kodiersequenz unter der Transkriptionskontrolle des Promotors befindet). Kodiersequenzen können funktionsfähig mit den Regulationssequenzen in der Sense- oder Antisense-Orientierung verknüpft sein.

[0047] Der Begriff „Expression", wie hierin verwendet, verweist auf die Transkription und stabile Akkumulation von Sense- (mRNA) oder Antisense-RNA, die sich vom erfindungsgemäßen Nukleinsäurefragment herleitet. Expression kann auch auf die Translation von mRNA in ein Polypeptid verweisen. „Antisense-Inhibition" verweist auf die Herstellung von Antisense-RNA-Transkripten, die zur Suppression der Expression des Zielproteins fähig sind. „Überexpression" verweist auf die Herstellung eines Genproduktes in transgenen Organismen, die die Herstellungsmengen in normalen oder nicht transformierten Organismen überschreitet. „Cosuppression" verweist auf die Produktion von Sense-RNA-Transkripten, die zur Suppression der Expression identischer oder im Wesentlichen ähnlicher fremder oder endogener Gene fähig sind (US-Patent Nr. 5,231,020).

[0048] „Veränderte Mengen" verweist auf die Herstellung eines Genprodukts oder von Genprodukten in transgenen Organismen in Mengen oder Anteilen, die sich von denen normaler oder nicht transformierter Organismen unterscheiden. „Veränderte" rheologische Eigenschaften der Stärke-Fructooligosaccharid-Mischung verweist auf eine Zu- oder Abnahme einer rheologischen Eigenschaft relativ zur Eigenschaft in einer Stärkelösung, worin es der Stärkelösung im Wesentlichen an Fructooligosacchariden mangelt und vorausgesetzt, dass die Stärkelösung im Wesentlichen die gleiche Stärkemenge wie die Mischung umfasst. Eine solche Stärkelösung, der es im Wesentlichen an Fructooligosacchariden mangelt, ist bevorzugt eine Fructooligosaccharid-freie Stärkelösung. Das bedeutet, dass die Lösung keine Fructooligosaccharide enthält, obwohl aufgrund von zum Beispiel einer Kontamination jedoch eine minimale Menge an Fructooligosacchariden vorliegen kann. Folglich werden erfindungsgemäße Mischungen, die jedweden prozentualen Anteil an Stärke enthalten, im Vergleich zu einer Stärkelösung mit keinen Fructooligosacchariden, umfassend im Wesentlichen die gleiche Stärkemenge wie die Mischung, verglichen.

[0049] „Zunahme" schließt zu erfindungsgemäßen Zwecken anheben, größer machen, augmentieren, amplifizieren, verstärken und erhöhen ein, ist aber nicht darauf beschränkt. „Abnahme" schließt zu erfindungsge-

mäßen Zwecken reduzieren, abnehmen, verringern, inhibieren und verhindern ein, ist aber nicht darauf beschränkt.

[0050] Rheologische Eigenschaften, die in der Stärke-Fructooligosaccharid-Mischung verändert werden können, schließen die Verkleisterungstemperatw und Endviskosität ein. Die Verkleisterungstemperatur (auch als die Gelatinierungstemperatur von Stärke bekannt) verweist auf die Onsettemperatur des Anstiegs der Viskosität einer Stärke-Lösung, wenn die Lösung erhitzt wird. H. F. Zobel (1984) in Starch: Chemistry and Technology, R. L. Whistler, J. N. BeMiller und E. F. Paschall, Hrsg., Academic Press Inc., San Diego, CA, S. 285 – 309. Die Verkleisterungstemperatur der Stärke-Fructooligosaccharid-Mischung kann erhöht oder vermindert werden. Eine Erhöhung der Verkleisterungstemperatw von ca. 30% auf ca. 1%, bevorzugter ca. 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12% 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28% oder 29% der Stärke-Fructooligosaccharid-Mischung im Vergleich zur Verkleisterungstemperatw einer Stärkelösung, die keine Fructooligosaccharide enthält, wird beobachtet. Eine Abnahme der Verkleisterungstemperatur von ca. 30% auf ca.1%, bevorzugter ca. 27% auf ca. 22% der erfindungsgemäßen Stärke-Fructooligosaccharid-Mischung wird bevorzugt über der Verkleisterungstemperatw der Stärkelösung mit keinen Fructooligosacchariden beobachtet.

[0051] Die Endviskosität verweist auf die Viskosität einer Lösung am Ende eines Kochexperimentes, auf das allgemein als auf eine Schnellviskositätsanalyse verwiesen wird, worin die Lösung erhitzt wird, bei einer stabilen Temperatur gehalten und dann abgekühlt und wieder stabil gehalten wird, während die Viskosität gemessen wird. Der Begriff „Endviskosität" und derartige Experimente sind dem Durchschnittsfachmann gut bekannt und werden zum Beispiel in F. T. Orthoefer (1987) in Corn: Chemistry und Technology, S. A. Watson und P. E. Ramstad, Hrsg., American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, S. 479 – 499, offenbart. Die Endviskosität der Stärke-Fructooligosaccharid-Mischung kann erhöht oder verringert werden. Eine Erhöhung der Endviskosität dergestalt, dass die Endviskosität bevorzugt 600% (das 6fache) auf ca. 20%, bevorzugter ca. 500% auf ca. 30% einer Stärke-Lösung mit keinen Fructooligosacchariden beträgt. Eine Abnahme der Endviskosität dergestalt, dass die Endviskosität bei ca. 10% bis ca. 30%, bevorzugter ca. 20%, einer Stärke-Lösung, die keine Fructooligosaccharide enthält, liegt.

[0052] „Matures" Protein verweist auf ein posttranslational verarbeitetes Polypeptid, d. h. eines, aus dem jedwede im primären Translationsprodukt vorliegenden Prä- und Propeptide entfernt wurden. „Präkursor"-Protein verweist auf das primäre Translationsprodukt der mRNA; d. h. in dem die Prä- und Propeptide noch anwesend sind. Prä- und Propeptide können intrazelluläre Lokalisierungssignale darstellen, sind aber nicht beschränkt darauf.

[0053] Die „ 3' nicht kodierenden Sequenzen" verweisen auf Nukelotidsequenzen, die sich nachgeschaltet von einer Kodiersequenz befinden und Polyadenylierungs-Erkennungssequenzen und andere Sequenzen, die Regulationssignale kodieren, die zur Beeinflussung des mRNA-Processing oder der Gen-Expression fähig sind, einschließen. Das Polyadenylierungssignal ist im Allgemeinen durch die Beeinflussung der Addition der Polyadenylsäuretrakte am 3'-Ende des mRNA-Präkursors gekennzeichnet. Die Verwendung verschiedener 3' nicht kodierender Sequenzen wird von Ingelbrecht et al. (1989) Plant Cell 1: 671 – 680, beispielhaft erläutert.

[0054] Ein „Chloroplast-Targeting-Signal" oder eine „Plastid-Targeting-Sequenz" ist eine Aminosäuresequenz, die zusammen mit einem Protein translatiert wird und das Protein an den Chloroplast oder andere Plastidtypen, wie zum Beispiel Amyloplasten, die in der Zelle vorhanden sind, richtet. „Chloroplast- oder Plastid-Targeting-Signalsequenz" verweist auf eine Nukleotidsequenz, die ein Chloroplast- oder Plastid-Targeting-Signalpeptid kodiert. Amyloplaste verweisen auf Organellen, in denen Reservestärke in höheren Pflanzenspezies synthetisiert wird.

[0055] Ein Fructosyltransferase-Enzym zur Verwendung im erfindungsgemäßen Konstrukt kann von Pflanzen, wie zum Beispiel von und nicht beschränkt auf Monocotyledonen (Triticum aestivum L., zum Beispiel) und Dicotyledonen (Cicorium intybus L., zum Beispiel) und Bakterienquellen, wie zum Beispiel von und nicht beschränkt auf Bacillus amyloliquefaciens, Streptococcus mutans und Erwinia herbicola wie auch Fungusquellen (Aspergillus niger und Aspergillus sydowi, zum Beispiel) bereitgestellt werden.

[0056] „Transformation" verweist auf den Transfer eines Nukleinsäurefragments in das Genom eines Wirtsorganismus, resultierend in genetisch stabilem Erbgut. Auf Wirtsorganismen, die die transformierten Nukleinsäurefragmente enthalten, wird als auf „transgene" Organismen verwiesen. Beispiele von Verfahren zur Pflanzentransformation schließen die Agrobacterium-vermittelte Transformation (De Blaere et al. (1987), Meth. Enzymol. 143:277) und Partikel-beschleunigte oder „Gen-Pistolen"-Transformationstechnologie (Klein et al.

(1987) Nature (London) 327: 70 – 73; US-Patent Nr. 4,945,050, ein.

[0057] Die hierin verwendeten standardmäßigen rekombinanten DNA- und molekularen Klonierverfahren sind im Stand der Technik weithin bekannt und sind ausführlicher in Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 1989 (hierin nachstehend „Maniatis") beschrieben.

[0058] „Fructosyltransferase" verweist auf ein Protein, für das von jedweder einen von mehreren Pflanzen oder mikrobiellen Genen mit der Eigenschaft des Herstellens eines Kohlenhydrat-Polymers, bestehend aus sich wiederholenden Fructoseresten, kodiert. Die sich wiederholenden Fructosereste können eine verknüpfte β-2-1-Verknüpfung oder eine β-2-6-Verknüpfung oder jedwede Kombination der beiden Verknüpfungstypen darstellen. Das Polymer der sich wiederholenden Fructosereste kann einen terminalen Glucoserest, der sich von einem Saccharosemolekül herleitet, und mindestens zwei Fructosereste enthalten. Auf das Polymer aus sich wiederholenden Fructoseresten in jedweder Form mit jedweder Kombination von Verknüpfungen und mit jedweder Anzahl von Fructoseresten wird im Allgemeinen als auf Fructyloligosaccharide oder „FOS" verwiesen.

[0059] Ein „Fructosyltransferase-Gen" verweist auf eine DNA-Sequenz, die mindestens einen Teil einer Kodiersequenz für ein Fructosyltransferase-Protein einschließt. „Plastid" verweist auf eine Membrangebundene Organelle in Pflanzenzellen, bei der es sich um den Ort der Kohlenhydrat-Herstellung oder -Speicherung handelt. Der Begriff „Plastid-targetiert" verweist auf ein Protein, das Signalsequenzen enthält, die in der Abgabe des Proteins an das und im Plastid resultieren. „Funktionalität" oder „funktionelle Eigenschaften" verweisen auf die spezifischen rheologischen Eigenschaften eines Polymers. Die rheologischen Eigenschaften verleihen ein spezifisches Charakteristikum am Polymer (gewöhnlich, aber nicht begrenzt auf Stärke) dergestalt, dass die Polymere in einer spezifischen Lebensmittel/Nichtlebensmittel-Applikation nützlich oder nützlicher werden.

[0060] Der Begriff „FOS/Stärke"- oder „Stärke/FOS"-Gemisch oder -Mischung verweist auf das miteinander Vermischen von Stärke und FOS. Die Polymere können kovalent oder sonst wie verknüpft sein. Die Polymere können sich untereinander umgeben oder vollkommen verknäult sein. Die eigentliche Assoziation von FOS und Stärke im Körnchen ist nicht kritisch, außer dass die Assoziation die physikalischen oder funktionellen Eigenschaften im Vergleich zu aus nicht transformierten Pflanzen isolierter Stärke verändert. Die Stärke-Fructooligosaccharid-Mischung umfasst bevorzugt ein Gewichtsverhältnis von Stärke zu Fructooligosacchariden von ca. 10: 1 bis ca. 1: 10, bevorzugter ca. 7: 1 bis ca. 1: 7.

[0061] Es wurden erfindungsgemäße chimäre Konstrukte beschrieben, umfassend gewebespezifische Regulationssequenzen und eine FTF-Kodiersequenz. Das chimäre Konstrukt ist zum Synthetisieren eines Fructose-Polymers unter Verwendung von Saccharose als ein Substrat fähig, wenn es in einer transgenen monocotyledonen Pflanze exprimiert wird. Die Expression des FTF-Gens resultiert in der Synthese von Fructose-Polymeren, die in zahlreichen Lebensmittel- und industriellen Applikationen nützlich sind. Eine transgene Maispflanze (Zea mays L.), die das FTF-Gen ordnungsgemäß exprimiert, unterscheidet sich selbst von einer generischen Pflanze der gleichen Spezies durch das Vorliegen der FOS-Akkumulation in den maturen Samen.

[0062] Die vorliegende Erfindung wendet sich an Pflanzen, insbesondere an Monocotyledonen, d. h. Pflanzen, die Reservestärke in triploidem Endosperm-Gewebe produzieren, insbesondere an Pflanzen aus der Familie Poaceae, einschließlich und nicht beschränkt auf Mais, Weizen, Gerste, Roggen, Tritical, Hafer und Sorghum Der Transfer der erfindungsgemäßen Nukleinsäurefragmente in eine Pflanze richtet die Expression eines FTF-Proteins auf eine Weise, die in der Akkumulation von Fructose-Polymeren, ohne Bedenken hinsichtlich eines Verlusts oder einer Veränderung des Polymers aufgrund von Pflanzenabbauenzymen während der Ernte, des Transports oder der Speicherung und ohne den Verlust von etablierten Coprodukten aus jedweder speziellen Spezies resultiert. Transgene Nutzpflanzen, die chimäre Gene enthalten, umfassend gewebespezifische Regulationssequenzen und eine FTF-Gensequenz, stellen eine erneuerbare Quelle von Fructose-Polymeren bereit. Die Akkumulation von FOS wird teilweise durch den Expressionsgrad des chimären Gens in transformierten Nutzpflanzen bestimmt. Der Expressionsgrad hängt teilweise von den gewebespezifischen Expressionssignalen, der Anzahl an Kopien des in das Pflanzengenom integrierten Gens und dem Ort der Genintegration ab; die FOS-Akkumulation kann auch von der Substratverfügbarkeit abhängen. Die dem Enzym zur Verfügung stehende Substratmenge kann durch die Spezies (einschließlich Mutanten in einer Spezies), den Gewebetyp, in dem die Expression auftritt, den subzellulären Expressionsort und die Entwicklungsstufe einer bestimmten Pflanze bestimmt werden. Die Stabilität des eingeführten Proteins kann auch die FOS-Akkumulation beeinflussen und hängt teilweise von seinem ordnungsgemäßen Processing, intrazellulären Targeting und der Funktionsfähigkeit in einer fremden Umgebung ab.

[0063] Die erfolgreiche Expression eines Gens mit Kohlenhydrat-Stoffwechseleigenschaften, wie zum Beispiel das SacB-Gen von Bacillus amyloliquefaciens, in einer transgenen Pflanze, würde die Berücksichtigung der folgenden Faktoren erforderlich machen: (1) die transformierte Spezies, (2) das spezifische Gewebe, in dem die Expression auftreten soll, (3) das spezifische zelluläre Kompartiment, in das das Enzym targetiert werden soll und (4) der genaue Zeitpunkt der Expression. Alle diese Faktoren müssen sorgfältig koordiniert werden, damit die Produktion von FOS in einer transgenen Zelle mit keiner nachteiligen Wirkung auftreten kann.

[0064] Die Expression eines Gens mit Saccharose metabolisierender Aktivität, wie zum Beispiel ein FTF-Protein in einer spezifischen transgenen Pflanzenspezies, würde nicht unbedingt die gleiche herbeiführen oder selbst eine gewünschte Wirkung herbeiführen, wenn es in einer alternativen Pflanzenspezies exprimiert würde. Unterschiede in den Kohlenhydrat-Profilen unter den Spezies weisen darauf hin, dass ein für Saccharose spezifisches Enzym nicht immer genügend Substrat zur Verfügung haben wird, um das gleiche Ergebnis herbeizuführen, wenn es in verschiedenen Spezies exprimiert wird. Es wurde gut etabliert, dass die Verfügbarkeit von Saccharose als ein Substrat nicht nur weitgehend von Spezies zu Spezies, sondern auch hinsichtlich der Mutanten innerhalb der gleichen Spezies variiert (Lampe et al. (1931) Bot. Gaz. 19: 337 – 380).

[0065] Mechanismen für den Saccharosetransport und die -akkumulation in Gewebe variiert weitgehend von einer Spezies zur anderen. Die Saccharose-Hydrolyse stellt einen integralen Teil des Importmechanismus im sich entwickelnden Maissamen dar (Porter et al. (1985) Plant Phys. 77: 524 – 531), ist aber keine Voraussetzung für den Transport zur Entwicklung des Sojabohnen-Embryos (Thome (1982) Plant Phys. 70: 953 – 958) oder dem Weizen-Endosperm (Jenner, Aust. J Plant Phys. 1: 319 – 329 (1974)). Deshalb kann die Expression eines FTF im Samen einer Spezies Zugang zu einer Fülle von Saccharose haben, wohingegen die FOS-Synthese im Samen einer anderen Spezies jedoch durch die Akkumulation von Hexose-Zuckern anstelle von Saccharose schwer behindert sein könnte.

[0066] Gewebe und entwicklungspezifische Expression eines Gens kann für den Promotor, die 3' nicht kodierende Region oder Kombinationen der beiden, die in chimären Konstrukten verwendet werden, intrinsisch sein. Zum Antreiben der Genexpression in transgenen Pflanzen verwendete Promotoren können sich von vielen Quellen herleiten, so lange der/die Promotoren) eine ausreichende transkriptionale Aktivität zur erfindungsgemäßen Ausführung durch Exprimieren der translatierbaren mRNA im gewünschten Wirtsgewebe aufweist/aufweisen. Bevorzugte Promotoren sind diejenigen, die eine Expxession spezifisch in Samen erlauben. Beispiele samenspezifischer Promotoren schließen die Promotoren von Samenspeicherproteinen ein, sind aber nicht darauf beschränkt. Die Samenspeicherproteine sind strikt reguliert, wobei sie fast ausschließlich in Samen auf eine hoch organspezifische und stufenspezifische Weise exprimiert werden (Higgins et al. (1984), Ann. Rev. Plant Physiol. 35: 191 – 221; Goldberg et al. (1989), Cell 56: 149 – 160; Thompson et al. (1989) BioEssays 10: 108 – 113). Darüber hinaus können verschiedene Samenspeicherproteine auf verschiedenen Stufen der Samenentwicklung exprimiert werden.

[0067] Es gibt augenblicklich zahlreiche Beispiele für die samenspezifische Expression der Samenspeicherprotein-Gene in transgenen Pflanzen. Diese schließen Gene aus Monocotyledonen, wie zum Beispiel Gersten-β-Hordein (Marris et al. (1988) Plant Mol. Biol. 10: 359 – 366) und Weizen-Glutenin ein (Colot et al. (1987) EMBO J. 6: 3559 – 3564). Darüber hinaus erhalten Promotoren samenspezifischer Gene, die funktionsfähig mit heterologen Kodiersequenzen in chimären Genkonstrukten verknüpft sind, ihr temporales und spatiales Expressionsmuster in transgenen Pflanzen aufrecht. Derartige Beispiele schließen die Verknüpfung von entweder den Phaseolin- oder Arabidopsis-2S-Albuminpromotoren mit der Kodiersequenz des 2S-Albumins der Paranuss und die Expression solcher Kombinationen in Tabak, Arabidopsis, oder Brassica napus (Altenbach et al. (1989) Plant Mol. Biol. 13: 513 – 522; Altenbach et al. (1992) Plant Mol. Biol. 18: 235 – 245; De Clercq et al. (1990) Plant Physiol. 94: 970 – 979), Bohnenlectin- und Bohnen-β-Phaseolin-Promotoren zur Expression von Luciferase (Riggs et al. (1989) Plant Sci. 63: 47 – 57) und Weizenglutenin-Promotoren zur Expression von Chloramphenicol-Acetyltransferase (Colot et al. (1987) EMBO J. 6: 3559–3564) ein.

[0068] Von besonderem Nutzen bei der Expression des/der erfindungsgemäßen Nukleinsäurefragmente(s) sind Promotoren aus mehreren sehr eingehend gekennzeichneten Maissamen-Speicherproteingenen, wie zum Beispiel Endosperm-spezifische Promotoren aus dem 10 kD-Zein-Gen (Kirihara et al. (1988) Gene 71: 359 – 370), dem 15 kD-Zein-Gen (Hoffmann et al. (1987) EMBO J. 6: 3213 – 3221; Schernthaner et al. (1988) EMBO J. 7: 1249 – 1253; Williamson et al. (1988) Plant Physiol. 88: 1002 – 1007), dem 27 kD-Zein-Gen (Prat et al. (1987) Gen 52: 51 – 49; Gallardo et al. (1988) Plant Sci. 54: 211 – 281) und das 19 kD-Zein-Gen (Marks et al. (1985) J. Biol. Chem. 260: 16451 – 16459). Es wurde berichtet, dass die relativen transkriptionalen Aktivitäten dieser Promotoren in Mais (Kodrzyck et al. (1989) Plant Cell 1: 105 – 114), eine Basis zur Wahl eines Promotors zur Verwendung in chimären Genkonstrukten für Mais bereitstellen. Die Promotoren, die die Ex-

pression von Genen antreiben, die an der Biosynthese von Stärke beteiligte Enzyme kodieren, können überdies bei der erfindungsgemäßen praktischen Ausführung verwendet werden. Diese schließen die 5' Regulationssequenzen der Saccharose-Synthase (Yang, N.-S. und Russell, D. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci 87: 4144 – 4148) und die Gene der wachsigen oder körnchengebundenen Stärke-Synthase I ein (Unger et al. (1991) Plant Physiol. 96: 124). Die Promotoren-Elemente können sich von anderen Stärke-Synthase-Genen (körnchengebundene und lösliche Isoformen), wenn diese verfügbar werden, und von den sh2- (Bhave et al. (1990) Plant Cell 2: 581 – 588) und bt2-Genen (Bae et al. (1990) Maydica 35: 317 – 322) herleiten, deren Produkte das Enzym ADP-Glucose-Phosphorylase konstituieren. Es wird daran gedacht, dass die Einführung von Enhancern oder Enhancer-ähnlichen Elementen in andere Promotor-Konstrukte auch erhöhte Grade primärer Transkription zur erfindungsgemäßen Ausführung bereitstellen. Diese würden virale Enhancer, wie zum Beispiel die, die im 35S-Promotor gefunden werden (Odell et al. (1988) Plant Mol. Biol. 10: 263 – 272, Enhancer aus den Opin-Genen (Fromm et al. (1989) Plant Cell 1: 977 – 984) oder Enhancer aus jedweder anderen Quelle, die in einer erhöhten Transkription resultieren, wenn sie in einen Promotor platziert werden, der funktionsfähig mit dem erfindungsgemäßen Nukleinsäurefragment verknüpft ist.

[0069] Aus den Adh-1- und Bz-1-Genen des Mais isolierte Introne (Callis et al. (1987) Genes Dev. 1: 1183 – 1200) und Intron 1 und Exon 1 des Shrunken-1-(sh-1)-Gens des Mais (Maas et al. (1991) Plant Mol. Biol 16: 199 – 207) können auch zur Erhöhung der Expression von eingeführten Genen nützlich sein. Die Ergebnisse mit dem ersten Intron des Mais-Alkoholdehydrogenase-(Adh-1)-Gens lassen erkennen, wenn dieses DNA-Element in die transkriptionale Einheit eines heterologen Gens platziert wird, dass die RNA-Spiegel um das 6,7fache über die normalen Spiegel erhöht werden können. Ein ähnliches Enhancement der Intron-Spiegel wurde unter Verwendung von Intron 3 eines Mais-Aktin-Gens (Luehrsen, K. R. und Walbot, V. (1991) Mol. Gen. Genet. 225: 81 – 93) beobachtet. Das Enhancement der Genexpression durch Adh1-Intron 6 (Oard et al. (1989) Plant Cell Rep 8: 156 – 160) wurde auch registriert. Exon 1 und Intron 1 des sh-1-Gens von Mais haben gezeigt, dass sie individuell die Expression von Reportergenen in Mais-Suspensionskulturen um das 10- bzw. 100fache erhöhen. Wenn diese Elemente in Kombination verwendet werden, wurde gezeigt, dass sie eine Stimulation der Reportergenexpression um das 1000fache herbeiführen (Maas et al. (1991) Plant Mol. Biol. 16: 199 – 207).

[0070] Jedwede 3' nicht kodierende Region, die zur Bereitstellung eines Polyadenylierungssignals und anderer Regulationssequenzen, die zur ordnungsgemäßen Expression erforderlich sind, fähig ist, kann zur eigentlichen erfindungsgemäßen Ausführung verwendet werden. Dies würde das 3'-Ende von jedwedem Speicherprotein, wie zum Beispiel das 3'-Ende der 10 kD-, 15 kD-, 27 kD- und α-Zein-Gene, das 3'-Ende des Bohnen-Phaseolin-Gens, das 3'-Ende des β-Conglycinin-Gens der Sojabohne, das 3'-Ende von viralen Genen, wie zum Beispiel das 3'-Ende der 35S- oder der 19S-Blumenkohlmosaikvirus-Transkripte, das 3'-Ende aus den Opin-Synthese-Genen, die 3'-Enden der Ribulose-1,5-bisphosphat-carboylase oder Chlorophyll-a/b-bindendes Protein oder die Sequenzen am 3'-Ende aus jedweder Quelle, wie zum Beispiel das der Sequenz einschließen, die zur Bereitstellung der notwendigen Regulationsinformation in seiner Nukleinsäuresequenz eingesetzt wird, um in der ordnungsgemäßen Expression der Promotor/Kodierregion-Kombination, mit der es funktionsfähig verknüpft ist, zu resultieren. Im Stand der Technik gibt es zahlreiche Beispiele, die die Nützlichkeit verschiedener 3' nicht kodierender Regionen lehren (siehe zum Beispiel Ingelbrecht et al. (1989) Plant Cell 1: 671 – 680).

[0071] Zahlreiche Gene aus mikrobiellen (Fouet, A. Arnaud, M., Klier, A. und Rapoport, G. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 119: 795 – 800; Shiroza, T. und Kuramitsu, H. K. (1988) J. Bacteriol. 170: 810 – 816; Tang, L. B., Lenstra, R., Borchert, T. V. und Nagarajan, V. (1990) Gene 96: 89 – 93) und Pflanzenquellen (Vijn et al. (1997) Plant J. 11: 387 – 398; Sprenger et al. (1997) Febs Lett. 400: 355 – 358; Van Tunen et al., WO 96/21023; Smeekens et al., WO 96/01904), kodierend Enzyme mit FTF-Aktivität, wurden isoliert und sequenziert. Bevorzugt unter diesen sind die sich von Mikroben herleitenden FTF-Gene von Bacillus amyloliquefaciens.

[0072] Die FTF-Gene können vom Durchschnittsfachmann mithilfe von Verfahren zur Isolierung von Genen eingesetzt werden, wenn die Nukleotidsequenz des gewünschten Gens bekannt ist oder wenn die Sequenz eines homologen Gens aus einem anderen Organismus bekannt ist. Die Sequenz-Information über das gewünschte Gen kann zur Herstellung von Oligonukleotidsonden zur Identifikation und Isolation des gesamten Gens aus einer geeigneten genetischen Bibliothek verwendet werden. Diese Bibliothek kann eine Genombibliothek sein, worin die Kodierregion auf einem einzelnem DNA-Fragment oder auf mehreren distinkten DNA-Fragmenten enthalten sein kann. Als Alternative kann die Bibliothek eine cDNA-Bibliothek sein, worin die Likelihood des Isolierens eines cDNA-Klons, umfassend die gesamte Kodierregion als eine unmittelbar angrenzende Sequenz größer ist. In jedem Fall kann der geeignete Klon oder können die geeigneten Klone mit-

tels DNA-DNA-Hybridisierung mit Sonden identifiziert werden, die einem oder mehreren Anteilen) der gewünschten Gene entsprechen. Als Alternative können Oligonukleotid-Primer hergestellt und als PCR-Primer eingesetzt werden, um alle oder einen Teil der Kodierregion aus genomischer DNA oder aus den vorstehend beschriebenen genomischen oder cDNA-Bibliotheken zu amplifizieren und anschließend zu isolieren.

[0073] Es können mehrere unterschiedliche Assays zum Nachweis der Expression der chimären Gene in Samen der transformierten Pflanzen verwendet werden. Für die FTF-Gene spezifische RNA-Transkripte können mithilfe der Southern- oder Northern-Analyse nachgewiesen werden. Das FTF-Protein kann extrahiert, nachgewiesen und immunologisch mithilfe von Verfahren, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind, quantifiziert werden. Als Alternative kann das Samengewebe gemahlen und mit einer polaren Lösung extrahiert werden, wobei Polysaccharide, einschließlich FOS isoliert und konzentriert werden, die dann nachgewiesen werden können durch: DC-Analyse in Kombination mit einer Kestose-spezifischen Färbung (Wise et al. (1955) Anal. Chem. 27: 33 – 36), HPLC-Analyse unter Verwendung von FOS-Standards (Chatterton et al. (1993) in: Fuchs A., Hrsg., Inulin and Inulin-containing crops. Elsevier, Amsterdam, S. 93 – 99); oder gefolgt von Hydrolyse und dann einem Enzym-verknüpften Assay (Brown, C. und Huber, S. (1987) Physiol. Plant 70: 537 – 543).

[0074] Dem Durchschnittsfachmann stehen verschiedene Verfahren zum Einführen einer DNA-Sequenz (chimäre Konstrukte, die FTF-Gene enthalten) in eukaryotische Zellen (d. h. Transformation) höherer Pflanzen zur Verfügung (siehe EPO-Veröffentlichungen 0 295 959 A2 und 0 138 341 A1). Derartige Verfahren schließen den ballistischen Beschuss bei hoher Geschwindigkeit mit Metallpartikeln, die mit den Nukleinsäurekonstrukten beschichtet sind (siehe Klein et al. (1987) Nature (London) 327: 70 – 73, und siehe US-Patent Nr. 4,945,050) wie auch die auf Transformationsvektoren basierenden, die auf den Ti- und Ri-Plasmiden von Agrobacterium spp., insbesondere dem binären Typ dieser Vektoren basieren, ein. Ti-hergeleitete Vektoren transformieren eine große Reihe verschiedener höherer Pflanzen, einschließlich monocotyledoner und dicotyledoner Pflanzen, wie zum Beispiel Sojabohnen, Baumwolle und Raps (Pacciotti et al. (1985), Bio/Techmology 3: 241, Byrne et al. (1987), Plant Cell, Tissue and Organ Culture 8: 3; Sukhapinda et al. (1987) Plant Mol. Biol. 8: 209–216; Lorz et al. (1985) Mol. Gen. Genet. 199: 178 – 182; Potrykus et al. (1985) Mol. Gen. Gent. 199: 183 – 188).

[0075] Andere Transformationsverfahren für chimäre Konstrukte, die FTF-Gene enthalten, wie zum Beispiel die direkte Aufnahme von Fremd-DNA-Konstrukten, (siehe EPO-Veröfentlichung 0 295 959 A2) und Elektroporationsverfahren (siehe Fromm et al. (1986) Nature (London) 319: 791 – 793), stehen dem Durchschnittsfachmann zur Verfügung. Die Zellen können, sobald sie transformiert sind, vom Durchschnittsfachmann regeneriert werden. Relevant waren auch mehrere kürzlich beschriebene Verfahren zum Einführen von Nukleinsäurefragmenten in kommerziell wichtige Nutzpflanzen, wie zum Beispiel Rapssamen (siehe De Block et al. (1989) Plant Physiol. 91: 694 – 701), Sonnenblumen (Everett et al. (1987) Bio/Technology 5: 1201 – 1204), Sojabohnen (McCabe et al. (1988) Bio/Technology 6: 923 – 926; Hinchee et al. (1988), Bio/Technology 6: 915 – 922; Chee et al. (1989), Plant Physiol. 91: 1212 – 1218; Christou et al. (1989), Proc. Natl. Acad. Sci USA 86: 7500 – 7504; EPO-Veröffentlichung 0 301 749 A2) und Mais (Gordon-Kamm et al. (1990), Plant Cell 2: 603 – 618; Fromm et al. (1990) Bio/Technology 8: 833 – 839). Ein Durchschnittsfachmann ist mit noch anderen Mitteln zur Herstellung transgener Maispflanzen, einschließlich der Einführung von DNA in Protoplasten und Regeneration von Pflanzen aus genannten Protoplasten (Omirulleh et al. (1993), Plant Mol. Biol. 21: 415 – 423), Elektroporation intakter Gewebe (D'Hulluin et al. (1992), Plant Cell 4: 1495 – 1505; Laursen et al. (1994), Plant Mol. Biol. 24: 51 – 61), Siliciumcarbid-vermittelte Fasertransformation von Maiszellen (Kaeppler et al. (1992), Theor. Appl. Genet. 84: 560 – 566; Frame et al. (1994) Plant J. 6: 941 – 948), vertraut. Außer dem vorstehend beschriebenen Verfahren des Partikelbeschusses von Mais-Kalluszellen ist ein Durchschnittsfachmann mit dem Partikelbeschuss von Mais-Scutellar- oder Suspensionskulturen zum Erhalt fertiler transgener Pflanzen vertraut (Koziel et al. (1993) Bio/Technology 11: 194 – 200; Walters et al. (1992) Plant Mol. Biol. 18: 189 – 200).

[0076] Sobald transgene Pflanzen mithilfe einer der vorstehend beschriebenen Verfahren erhalten werden, ist es erforderlich, individuelle Transgene auf die zu durchsuchen, die am effektivsten den gewünschten Phänotyp anzeigen. Es ist dem Durchschnittsfachmann zur Genüge bekannt, dass individuelle transgene Pflanzen, die das gleiche Konstrukt tragen, sich hinsichtlich der Expressionsgrade unterscheiden können; auf dieses Phänomen wird häufig als auf den „Positionseffekt" verwiesen. Wenn das zur Frage stehende Konstrukt zum Beispiel zum Exprimieren höherer Spiegel des Gens von Interesse bestimmt ist, werden individuelle Pflanzen hinsichtlich der Menge des produzierten Proteins und folglich der Enzymaktivität variieren; dies wiederum wird sich auf den Phänotyp auswirken. Dies sollte nicht als eine Einschränkung der vorliegenden Erfindung angesehen werden, sondern vielmehr als eine praktische Angelegenheit, die vom Durchschnittsfachmann erkannt und antizipiert wird. Demgemäß wird der Durchschnittsfachmann Verfahren zum Screening großer Transformantenzahlen entwickeln. Die Art dieser Screenings wird im Allgemeinen aus praktischen Erwägungen gewählt und ist kein inhärenter erfindungsgemäßer Teil.

BEISPIELE

[0077] Die vorliegende Erfindung wird weiter anhand der folgenden Beispiele definiert. Es wird erkannt werden, dass die Beispiele lediglich zur Erläuterung gegeben werden und die vorliegende Erfindung nicht auf die in den Beispielen beschriebenen Verwendungen begrenzt ist. Die vorliegende Erfindung kann zur Herbeiführung transgener Maispflanzen, deren Kohlenhydratprofil im Samen durch Akkumulation von Fructose-Polymeren verändert werden und wo seine Eigenschaften nützlich sind, wie zum Beispiel in, aber nicht begrenzt auf Lebensmittel, Papier, Kunststoffe, Klebstoffe oder Anstrichstoffe, verwendet werden.

BEISPIEL 1

Chimäres Konstrukt zur Expression des Plastid-targetierten FTF-Gens von Bacillus amyloliquefaciens in transgenem Zea mays L.

[0078] Der Aufbau des Mais-Endosperms, die spezifische Expression des Vektors, die in dieser Beschreibung verwendet wurden, wurde durch Isolierung einer Region der Mais-DNA, die ein RuBP-Carboxylase-Chloroplast-Targeting-Signal kodiert (beschrieben in US-Patent Nr. 5,773,691) erreicht. Das Chloroplast-Targeting-Signal besteht aus einem aus 47 Aminosäuren bestehenden Peptidfragment (SEQ ID NO:2), kodiert durch einen Anteil des Mais-RuBP-Carboxylase-Gens (RUBISCO-Gens). Ein DNA-Fragment von 183 bp (SEQ ID NO:1), kodierend das Chloroplast-Targeting-Signal, wurde isoliert und anschließend in den Expressionsvektor pCyt-Sac ligiert (Caimi et al., Plant Physiology 110: 355 – 363 (1996), der zuvor mit den Enzymen NcoI und EcoRV aufgeschlossen wurde. Das endgültige Konstrukt (10 kD-CTS-Sac) enthielt einen Endosperm-spezifischen 10 kD-Zein-Promotor und ein 3'-Ende, zusätzlich zum Chloroplast-Targeting-Signal, fusioniert im Rahmen, an das SacB-Gen von Bacillus amyloliquefaciens (**Fig. 1**), welches das FTF-Gen kodiert. Ein erfindungsgemäß nützliches SacB-Gen wurde in Tang et al. (1990) Gene 96: 89 – 93; Nagarajan et al., US-Patent Nr. 5,162,2070 und Caimi et al., WO 95 13,389) beschrieben. Die DNA-Quelle, aus der das FTF-Gen aus Bacillus amyloliquefaciens isoliert wurde, ist von der American Type Culture Collection (Manassas, VA) erhältlich.

[0079] Die Mais-Endosperm-Expressionskassette (10 kD-CTS-Sac), die den 10 kD-Zein-Promotor, das Chloroplast-Targeting-Signal, die SacB-Kodiersequenz und das 3'-Ende von 10 kD enthält, wurde durch Aufschluss mit SmaI und BamHI isoliert, dann in einen Plasmidvektor zur Vorbereitung der Transformation in Mais ligiert.

Pflanzenmaterial und Transformation

[0080] Das vorstehend beschriebene chimäre Gen wurde dann anhand des folgenden Verfahrens in Maiszellen eingeführt. Immature Maisembryos wurden aus den Entwicklungscaryopsen, die sich vom Kreuzen der Inzucht-Maislinien H99 und LH132 herleiten, präpariert (Gerdes et al. (1993), Compilation of North American Maize Breeding Germplasm. Redaktionsausschuss, W. F. Tracy et al. Crop Science Society of America, Inc. Madison, WI). Die Embryos wurden 10 bis 11 Tage nach der Bestäubung, wenn sie 1,0 bis 1,5 mm lang waren, isoliert. Die Embryos wurden dann mit der Achsenseite nach unten und in Kontakt mit Agarose-verfestigtem N6-Medium platziert (Chu et al. (1975) Sci. Sin. Peking 18: 659 – 668). Die Embryos wurden bei 27°C im Dunkeln gehalten und wurden als brüchiger embryogener Kallus, bestehend aus undifferenzierten Zellmassen mit somatischen Proembryoiden und an den Suspensor-Strukturen getragenen Embryoiden, die aus dem Scutellum der immaturen Embryos proliferieren, gekennzeichnet. Der aus der primären Expflanze isolierte embryogene Kallus wurde auf N6-Medium kultiviert und auf diesem Medium alle 2 bis 3 Wochen subkultiviert.

[0081] Ein Plasmid, p35S/Ac (erhalten von Dr. Peter Eckes, Hoechst AG, Frankfurt, Deutschland), das das pat-Gen beherbergt (das die Phosphinothricin-Acetyltransferase kodiert (siehe Europäische Patentveröffentlichung 0 242 236), wurde in Transformationsexperimenten verwendet, um einen selektierbaren Marker bereitzustellen. Das Enzym PAT verleiht Resistenz gegen herbizide Glutaminsynthetase-Inhibitoren, wie zum Beispiel Phosphinothricin. Das pat-Gen wurde unter die Kontrolle des 35S-Promotors aus dem Blumenkohlmosaikvirus (Odell et al. (1985) Nature 313: 810 – 812) und der 3'-Region des Nopalin-Synthase-Gens aus der T-DNA des Ti-Plasmids von Agrobacterium tumefaciens gebracht.

[0082] Das Partikelbeschussverfahren (Klein et al. (1987) Nature 327: 70 – 73) wurde zum Transferieren von Genen an die Kalluskulturzellen verwendet. Gemäß diesem Verfahren wurden Goldpartikel (1 µm im Durchmesser) unter Verwendung des folgenden Verfahrens mit DNA beschichtet. Zehn µg Plasmid-DNA wurden 50 µl einer Suspension aus Goldpartikeln (60 mg pro ml) zugefügt. Calciumchlorid (50 µl einer 2,5 M Lösung) und Spermidin-freie Base (20 µl einer 1,0 M Lösung) wurden den Partikeln zugefügt. Die Suspension wurde während des Zufügens dieser Lösungen gevortext. Nach 10 Minuten wurden die Röhrchen kurz zentrifugiert (5 sec

bei 15 000 U/min) und der Überstand entfernt. Die Partikel wurden in 200 µl absolutem Ethanol suspendiert, wieder zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Spülen mit Ethanol wurde wieder durchgeführt und die Partikel im Endvolumen aus 30 µl Ethanol suspendiert. Ein Aliquot (5 µl) der DNA-beschichteten Goldpartikel wurde in die Mitte einer Kapton™-Flying Disc (Bio-RAD Labs) platziert. Die Partikel wurden dann mit einem Biolistic™-PDS-1000/He (Bio-Rad Instruments, Hercules CA) unter Verwendung eines Heliumdrucks von 1000 psi, einem Spaltabstand von 0,5 cm und einer Flugdistanz von 1,0 cm, in das Maisgewebe platziert.

[0083] Das embryogene Gewebe wurde zum Beschuss auf Filterpapier über mit Agarose-verfestigtem N6-Medium platziert. Das Gewebe wurde als ein dünner Rasen angeordnet und bedeckte einen kreisförmigen Bereich von ca. 5 cm im Durchmesser. Die das Gewebe enthaltende Petrischale wurde in die Kammer des Biolistic™-PDS-1000/He ca. 8 cm vom Stopp-Screen platziert. Die Luft in der Kammer wurde dann auf ein Vakuum von 28 Inch Hg evakuiert. Der Makroträger wurde mit einer Helium-Schockwelle unter Verwendung einer Berstmembran, die platzt, wenn der He-Druck im Schockröhrchen 1000 psi erreicht, beschleunigt.

[0084] Sieben Tage nach dem Beschuss wurde das Gewebe an das N6-Medium, das Glufosinat (2 mg pro Liter) enthält und dem es an Casein oder Prolin mangelt, überführt. Das Gewebe wuchs auf diesem Medium weiterhin langsam. Nach zusätzlichen 2 Wochen wurde das Gewebe in frisches N6-Medium, enthaltend Glufosinat, überführt. Nach 6 Wochen, wurden Flächen von ca. 1 cm Durchmesser des aktiv wachsenden Kallus auf Platten identifiziert, die das mit Glufosinat supplementierte Medium enthielten. Die Kalli wuchsen bei Anlegen von Subkulturen weiterhin auf dem Selektivmedium.

[0085] Die Pflanzen wurden aus dem transgenen Kallus durch zuerst Transferieren von Gewebe-Clusters an das N6-Medium, supplementiert mit 0,2 mg pro Liter 2,4-D regeneriert. Nach zwei Wochen wurde das Gewebe an das Regenerationsmedium überführt (Fromm et al. (1990) Bio/Technology 8: 833 – 839).

Analyse transgener Maislinien, enthaltend das chimäre 10 kD-CTS-Sac-Gen

[0086] Die Charakterisierung und Bestätigung der FTF-Aktivität im transgenen Gewebe wurde in Caimi et al., WO 95 13389; Caimi et al. (1996) Plant Physiol. 110: 355 – 363; Caimi et al. (1997) New Phytol. 136: 19 – 28, beschrieben.

[0087] Individuelle mature Samen wurden auf das Vorliegen und die Konzentration von FOS durch Mahlen zu einem feinen Pulver und Suspension in 80% Ethanol in Wasser analysiert. Die Lösung wurde 10 Minuten auf 65°C erhitzt und bei 2500 × g zentrifugiert. Der Überstand, enthaltend lösliche Kohlenhydrate, wurde verworfen und das Pellet in 80%igem Ethanol suspendiert. Der Extraktionsschritt mit löslichem Kohlenhydrat wurde zweimal wiederholt. Das resultierende Pellet wurde mit Wasser extrahiert und der FOS-Gehalt anhand des in Yaphe und Arsenault (1965), Anal Biochem 13: 143 – 148, beschriebenen Resorcinol-Verfahrens bestimmt. Beispiele der FOS-Konzentration in Samen, die die 10 kD-CTS-Sac-Expressionskassette enthalten, sind in **Fig. 2** ersichtlich.

[0088] Die zusätzliche Charakterisierung von FOS aus einzelnen Samen wurde durch Auftüpfeln von 3 – 5 µl der vorstehend beschriebenen Wasserextraktion auf eine DC-Platte erreicht. Die DC-Platte wurde zweimal nach dem Verfahren von Wise et al. ((1955) Anal Chem 27: 33 – 36) in Butanol: Propanol: Wasser (12:3:4) entwickelt. Die FOS-Signale wurden nach dem Sprühen der Platte mit einem Harnstoff/Phosphorsäure-Gemisch (Wise et al. (1955) Anal Chem 27: 33 – 36) und 10 minütigem Erhitzen auf 100°C sichtbar gemacht. Positive Signale am Startfleck der Platte deuten auf das Vorliegen von FOS mit hohem Molekulargewicht hin (**Fig. 3**).

BEISPIEL 2

Stärke-Analyse von transgenen Linien, enthaltend das chimäre 10 kD-CT-Sac-Gen

[0089] Da Endosperm-Plastide von Mais in der Regel große Mengen Stärke, ein Glucose-Polymer, akkumulieren, war es interessant zu bestimmen, ob die Stärke in FOS akkumulierenden Linien hinsichtlich Struktur oder Funktionalität verändert war. Stärke wurde aus einzelnen Samen, die aus mit dem 10 kD-CTS-Sac-Konstrukt transformierten Maispflanzen erhalten wurden, extrahiert. Die Samen wurden in einer Lösung, enthaltend 1,0% Milchsäure und 0,3% Natriummetabisulfit, pH 3,82, eingeweicht und 22 – 24 h bei 52°C gehalten. Die Samen wurden ablaufen lassen, gespült und individuell in 8 – 9 ml einer 100 mM NaCl-Lösung homogenisiert. Jedem Röhrchen wurden 5 ml Toluen zugefügt, die Röhrchen wurden zweimal 6 Minuten lang kräftig geschüttelt. Die Lösungen wurden 30 Minuten absetzen lassen. Jedem Röhrchen wurden 2 ml 100 mM NaCl zu-

gefügt, und die Lösungen wurden weitere 30 Minuten absetzen lassen. Als Nächstes wurde die Protein-Toluen-Schicht abgesaugt. Der Toluen-Waschschritt wurde wiederholt. Jedem Röhrchen wurden 12 ml Wasser zugefügt und die Gemische in einem Anstrichstoff-Schüttelgerät 45 Sekunden geschüttelt. Die Lösungen wurden 10 Minuten in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, und danach wurde das Wasser entfernt. Das Waschen mit Wasser wurde wiederholt, gefolgt von abschließendem Waschen mit 12 ml Aceton. Nach den Schüttel- und Zentrifugationsschritten wurde das Aceton ablaufen und 1 h verdampfen lassen. Die Stärke-Extrakte wurden in einem Ofen von 40°C über Nacht inkubiert, um jedwedes rückständige Aceton auszutreiben.

Mikroskopische Beobachtung isolierter Stärkekörnchen

[0090] Die Rasterelektronenmikroskopie wurde zur Untersuchung der Morphologie von intakten Stärkekörnchen, die aus FOS akkumulierenden und nicht akkumulierenden Samen isoliert wurden, verwendet. Fig. 4 zeigt Mikrofotografien von Stärkekörnchen aus zwei repräsentativen Linien. XBG02167-1 ist ein Samen, dem es an FOS mangelt. Stärkekörnchen aus dieser Linie scheinen normal zu sein, wobei sie das polygonale Aussehen typischer Maisstärkekörnchen aufweisen. XBG02167-2 ist ein FOS akkumulierender Samen. Es kann gesehen werden, dass die Stärkekörnchen aus diesem ein sehr unterschiedliches Aussehen aufweisen. Die Körnchen sind elongiert und haben eine unregelmäßige Form. Sie sind auch im Allgemeinen kleiner als die Körnchen aus dem Samen XBG02167-1. Die Oberfläche der Körnchen ist auch hoch unregelmäßig und sieht viel gröber als die Körnchen von normalem Dentmais aus.

Strukturanalyse von Stärke

[0091] Extrahierte Stärken wurden wie folgt enzymatisch „debranched". Einem Teströhrchen mit Schraubverschluss mit 1,1 ml Wasser wurden 7 mg von jeder Stärkeprobe zugefügt. Die Röhrchen wurden 30 Minuten auf 120°C erhitzt und dann bei 45°C in ein Wasserbad gegeben. Die „Debranching"-Lösung wurde durch Verdünnung von 50 µl Isoamylase (5×10^6 Einheiten/ml, Sigma) pro ml Natriumacetat-Puffer (50 mM, pH 4,5) hergestellt. Jeder Stärkeprobe wurden 40 µl der „Debranching"-Lösung zugefügt und 3 h bei 45°C inkubiert. Die Reaktionen wurden 5 Minuten durch Erhitzen auf 110°C terminiert. Die „debranched" Stärkeproben wurden lyophilisiert und in DMSO zur Analyse mittels der Gelpermeationschromatographie (GPC) aufgelöst. Zehn µl der „debranched" Stärke wurden injiziert und durch 3 englumige Säulen (Polymer Labs, Mini-Mix C, D, E mit einer Mini-Mix C Schutzsäule) in Reihe bei 90°C laufen lassen und mit DMSO bei einer Fließrate von 0,35 ml/min eluiert. Das Probenentnahmeintervall betrug 35 Minuten. Ein Brechungsindex-Detektor (Waters) wurde mit einem Computer verwendet, wobei das Waters Millenium Chromatographie-Manager-System unter GPC-Option (Version 2.15.1, Waters Corp.) zum Nachweis und der Datenerfassung bzw. -analyse lief. Die Retentionszeiten der Pullulan-Standards (Standard 1: 380 K, 100 K, 23,7 K, 5,8 K, 666 und 180 MG, Standard 2: 853 K, 186 K, 48 K und 12,2 K) wurden zur Etablierung einer Kalibration der 3. Ordnung und Berechnung der Molekulargewichtsverteilungen in der Millenium-Software verwendet.

[0092] Wie dem Durchschnittsfachmann bekannt ist, sind mittels Partikelbeschuss hergestellte transgene Maispflanzen in der Regel hemizygot für das eingeführte Transgen und werden das Transgen auf vorhersagbare Mendelsche Weise segregieren. Auf der selbstpollinierten Ähre einer R0-Pflanze segregiert das triploide Endosperm, bei dem es sich um das für die Stärkeproduktion verantwortliche Gewebe handelt, das eingeführte Transgen. Drei Segreganten, die FOS (XBG02118-5, XBG02118-6 und XBG02118-7) enthielten und 4 Samen, die kein FOS (XBG02118-1, XBG02118-2, XBG02118-3 und XBG02118-4) enthielten, wurden aus einer selbstpollinierten Ähre der R0-Pflanze XBG02118 ausgewählt und wurden zum Erhalt von Stärke extrahiert und auf die wie vorstehend beschriebene Stärkestruktur analysiert. Fig. 5 zeigt die Molekulargewichtsverteilungen repräsentativer „debranched" Stärken aus FOS akkumulierenden und nicht akkumulierenden Samen.

[0093] Molekulargewichtsverteilungen repräsentativer „debranched" Stärken aus FOS akkumulierenden und nicht akkumulierenden Samen.

[0094] Wie in Fig. 5 ersichtlich ist, produziert die Linie XBG02118 Stärken mit zwei unterschiedlichen Typen der Molekulargewichtsverteilungen. Die Molekulargewichtsverteilungen von „debranched" Stärke aus Samen von sowohl FOS akkumulierenden als auch nicht akkumulierenden Linien sind im Allgemeinen typisch für die für normale Dentmaisstärke beobachtete Molekulargewichtsverteilung. Die FOS akkumulierenden Samen (d. h. XBG02118-5) enthalten jedoch eine geringe Zunahme des Verhältnisses von Material von log MG > 4,2 zur Menge von Material von log MG < 4,2. Das Material von log MG > 4,2 wird als Amylose klassifiziert, und das Material von log MG < 4,2 wird als Amylose klassifiziert (basierend auf dem Vergleich von Stärken aus normalem Mais und Wachsmais). Da der Nachweis des RI nicht selektiv ist, könnte dass überschüssige Material mit hohem Molekulargewicht Amylose (α 1–4, verknüpftes Glucose-Polymer), FOS-Polymer oder aberrante Stärke

sein, die partiell resistent gegen die Isoamylase ist. Das Verhältnis des Materials von log MG > 4,2 zu Material von log MG < 4,2 wurde für drei verschiedene FOS akkumulierende Linien durch die „Debranching"-Analyse und Integration unter Verwendung der Millenium-Software verglichen.

TABELLE 1

Quantitativer Vergleich der Materialkomponente mit hohem Molekulargewicht von „debranched" Stärken aus Samen mit und ohne FOS

Linie		Masse (%) des Materials log MG > 4,2	Standardfehler
XBG02045	Fructan	30,16	0,47
	Kein Fructan	24,03	0,30
XBG02167	Fructaan	38,63	1,60
	Kein Fructan	24,85	0,31
XBG02118	Fructan	31,35	0,48
	Kein Fructan	24,38	0,22

[0095] Aus diesem Ergebnis ist ersichtlich, dass das Plastid-Targeting des SacB-Genprodukts in Mais-Endosperm nicht nur in der Akkumulation von FOS resultiert, sondern auch Anlass zu einer Veränderung der durch diese Samen hergestellten Stärkestruktur gibt. Zur Bestimmung, ob das FOS-Polymer aus der gereinigten Stärke rückgewonnen werden könnte, wurden die Proben in Wasser suspendiert und 10 Minuten auf 65°C erhitzt. Die Aufschlämmung wurde 10 Minuten bei 5000 × g zentrifugiert und 3 µl des Überstandes auf eine DC-Platte getüpfelt. Die Sichtbarmachung von FOS wurde mithilfe der in Beispiel 1 vorstehend beschriebenen Verfahren erreicht. Die DC-Platte (**Fig. 6**) weist auf das Vorliegen von FOS in den verarbeiteten Stärkeproben hin.

BEISPIEL 3

[0096] Funktionsanalyse von Stärke die von Samen, die Plastid-targetierte SacB exprimieren, produziert wird.

[0097] Um eine größere Stärkemenge zur Funktionsanalyse zu erhalten, wurden 15 g FOS enthaltende Körner aus zwei Linien identifiziert, die Plastid-targetierte SacB (XAW00361, XAW00363) tragen. Für jede Linie wurden 15 g Körner in einen 50 ml fassenden Erlenmeyer-Kolben abgewogen und 18 h bei 52°C in 50 ml Einweichlösung (siehe Beispiel 2) eingetaucht. Die Körner wurden dann ablaufen lassen und mit Wasser gespült. Die Körner wurden unter Verwendung einer Polytron-Sonde von 20 mm (Kinematica GmbH; Kriens-Luzern, Schweiz) in 50 ml kalter 50 mM NaCl homogenisiert. Das Homogenat wurde durch ein Sieb von 72 Mikron Maschenweite filtriert. Das Filtrat wurde mit 50 mM NaCl auf ein Gesamtvolumen von 400 ml gebracht, und ein gleiches Volumen Toluol wurde zugefügt. Das Gemisch wurde dann 1 h mit einem Magnetrührstab bei ausreichender Geschwindigkeit zur vollständigen Emulgierung der beiden Phasen gerührt. Die Emulsion konnte sich über Nacht in einem abgedeckten Becher trennen. Die obere Toluen-Schicht wurde aus dem Becher abgesaugt und verworfen. Die Stärkeaufschlämmung, die auf dem Boden des Bechers zurückblieb, wurde suspendiert, in eine 250 ml fassende Zentrifugenflasche gegossen und 15 Minuten bei 25 000 relativer Zentrifugalkraft zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und die Stärke wurde nacheinander mit Wasser und Aceton unter Schütteln gewaschen und wie vorstehend zentrifugiert. Nach dem Waschen mit Aceton und der Zentrifugation wurde das Aceton dekantiert und die Stärke über Nacht in einem Abzug bei Raumtemperatur trocknen lassen.

[0098] Ein Rapid Visco Analyzer 4 (RVA) (Newport Scientific; Sydney, Australien) und Thermocline-Software for Windows (Version 2.0) wurden zur Verkleisterungskurvenanalyse verwendet, und die Stärken aus FOS akkumulierenden Linien wurden mit Stärke aus normalem Dentmais verglichen. Für jede Linie wurden 1,5 ± 0,0025 g Stärke in einen neuen RVA-Probenbehälter aus Aluminium vorgelegt, und es wurden 25 ± 0,1 ml 0,66%iger Natriumphosphat-Puffer (zweibasisch, Heptahydrat), pH 6,5, zugefügt. Es wurde angenommen, dass der Feuchtegehalt der Stärke bei 10% lag, wobei sich eine Gesamtfeststoffkonzentration von 5% ergab. Es wurde ein Rührdeckel auf den Behälter platziert, und die Aufschlämmung durch schnelle Drehung des De-

ckels gerührt. Die Probe wurde dann unter dem folgenden Profil laufen lassen:

Paddle-Geschwindigkeit:	0 - 10 s	960 U/min
	11 s - 16 min	160 U/min
Temperatur:	0 - 1 min	50°C
	1 min - 5 min	50°C → 95°C
	5 min - 8 min	95°C
	8 min - 12 min	95°C → 50°C
	12 min - 16 min	50°C

[0099] (Die Einzeltemperatur zeigt Halten bei dieser Zieltemperatur an. Die Auflistung von Zweifachtemperaturen zeigt die Anfangs- und Endtemperaturen über den ausgewählten Zeitrahmen mit einer konstanten Heizratenzunahme an.)

[0100] Fig. 7 zeigt die Verkleisterungskurven von normaler Dentmaisstärke und der Stärke von FOS enthaltenden Linien. Die Stärken aus den FOS akkumulierenden Linien weisen im Vergleich zu Stärke aus Kontrollmais sehr unterschiedliche Verkleisterungseigenschaften auf. Das Einsetzen des Verkleisterns erfolgt bei einer höheren Temperatur als für Kontrollmais, und die Peak-Viskosität ist niedriger. Folglich führt das Targeting des SacB-Genprodukts auf Endosperm-Plastide nicht nur zur Akkumulation von FOS in hohen Konzentrationen, sondern ändert auch die Funktionalität von in den gleichen Plastiden produzierter Stärke.

<110> E. I.. du Pont de Nemours and Company

<120> Fructose-Polymer-Synthese in monocotyledonen Plastiden

<130> BB1347

<140>

<141>

<150> 60/166, 268

<151> 18.11.1999

<160> 2

<170> Microsoft Office 97

<210> 1

<211> 183

<212> DNA

<213> Zea mays

<400> 1

```
atggcgccca ccgtgatgat ggcctcgtcg gccaccgccg tcgctccgtt ccaggggctt  60
aagtccaccg ccagcctccc cgtcgcccgc cgctcctcta gaagcctcgg caacgtcagc 120
aacggcggaa gaatccggtg catggccagt gtgattgcgc aggcaggggc gaaaggtcgt 180
cag                                                               183
```

<210> 2

<211> 47

<212> PRT

<213> Zea mays

<400> 2

```
Met ala Pro Thr Val Met Met Ala Ser Ser Ala Thr Ala Val Ala Pro
  1               5                  10                  15

Phe Trp Gly Leu Lys Ser Thr Ala Ser Leu Pro Val Ala Arg Arg Ser
             20                  25                  30

Ser Arg Ser Leu Gly Asn Val Ser Asn Gly Gly Arg Ile Arg Cys
         35                  40                  45
```

Patentansprüche

1. Rekombinantes DNA-Konstrukt, umfassend einen gewebespezifischen Promotor, der funktionsfähig mit einer Plastid-Targeting-Sequenz verknüpft ist, die funktionsfähig mit einer Kodiersequenz für ein Fructosyltransferase-Gen dergestalt verknüpft ist, dass das Konstrukt zum Erhalt der Produktion von Fructooligosacchariden im Plastid der Monocotyledon-Zelle eine Monocotyledon-Zelle transformieren kann.

2. Rekombinantes DNA-Konstrukt nach Anspruch 1, worin der Monocotyledon aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus Mais, Weizen, Reis, Gerste, Sorghum, Tritical und Roggen.

3. Mit einem Konstrukt nach Anspruch 1 dergestalt transformierten Monocotyledon, dass der Monocotyledon Fructooligosaccharide produziert, die sich im Plastid in Zellen des Monocotyledons akkumulieren.

4. Verfahren zum Produzieren von Fructooligosacchariden umfassend das Anbauen des Monocotyledons nach Anspruch 3, Ernten des Monocotyledons und Extrahieren der Fructooligosaccharide aus dem geernteten Monocotyledon.

5. Rekombinantes DNA-Konstrukt nach Anspruch 1, worin der gewebespezifische Promotor für Samen spezifisch ist.

6. Mit dem Konstrukt nach Anspruch 1 transformierten Monocotyledon, worin der Monocotyledon Fructooligosaccharide produziert, die sich in einem Samen des Monocotyledons akkumulieren.

7. Verfahren zur Erhöhung der Fructooligosaccharid-Konzentrationen in einem Monocotyledon, umfassend das Insertieren eines rekombinanten DNA-Konstrukts in eine Monocotyledon-Zelle, umfassend einen gewebespezifischen Promotor, der funktionsfähig mit einer Plastid-Targeting-Sequenz verknüpft ist, die funktionsfähig mit einer Kodiersequenz für ein Fructosyltransferase-Gen dergestalt verknüpft ist, dass das Konstrukt eine Monocotyledon-Zelle transformieren kann und der transformierte Monocotyledon Fructooligosaccharide synthetisiert und akkumuliert.

8. Verfahren nach Anspruch 7, worin der Monocotyledon aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus Mais, Weizen, Reis, Gerste, Sorghum, Tritical und Roggen.

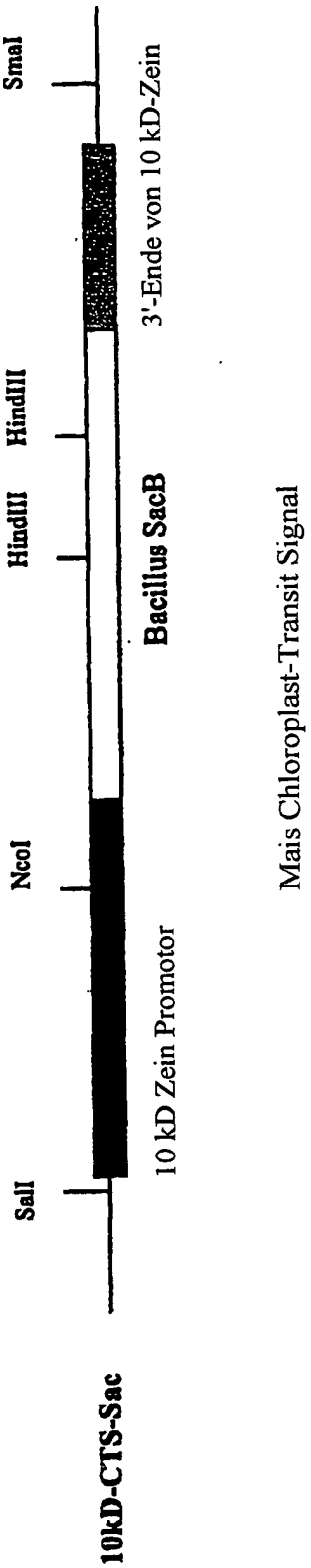
9. Ein mit dem Konstrukt nach Anspruch 1 transformierten Monocotyledon.

10. Aus dem transformierten Monocotyledon nach Anspruch 7 produzierter Samen.

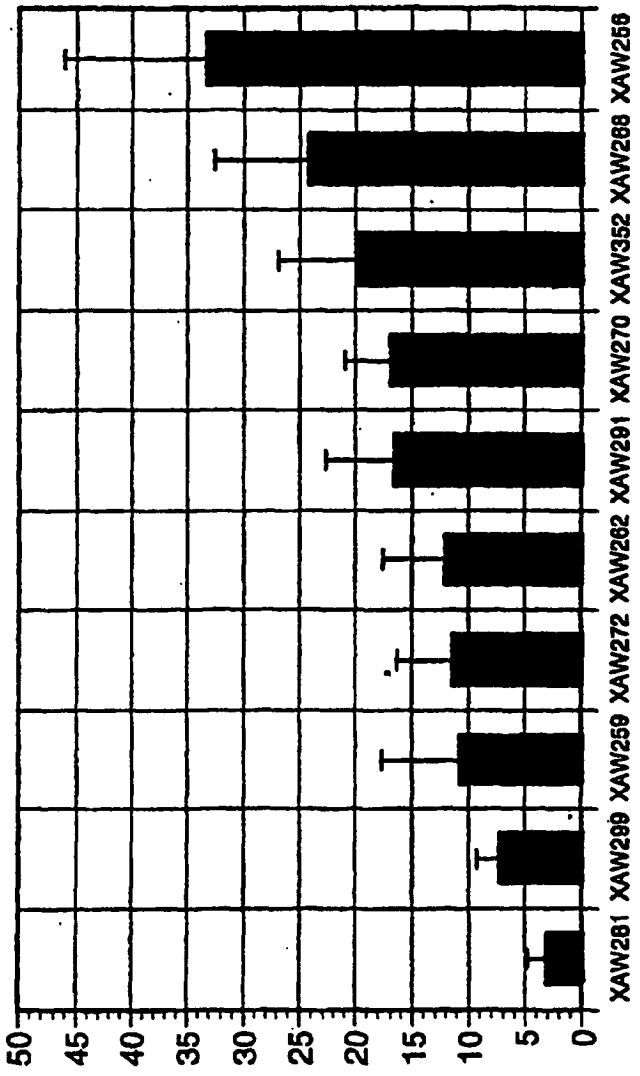
11. Verfahren zur Herstellung einer Stärke-Fructooligosaccharid-Mischung, umfassend das Insertieren eines rekombinanten DNA-Konstrukts in eine Monocotyledon-Zelle, umfassend einen gewebespezifischen Promotor, der funktionsfähig mit einer Plastid-Targeting-Sequenz verknüpft ist, die funktionsfähig mit einer Kodiersequenz für ein Fructosyltransferase-Gen zur Produktion einer transgenen monocotyledonen Pflanze verknüpft ist, Anbauen der Pflanze, Ernten der Pflanze und Extrahieren der Fructooligosaccharid/Stärke-Mischung aus der geernteten Pflanze.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

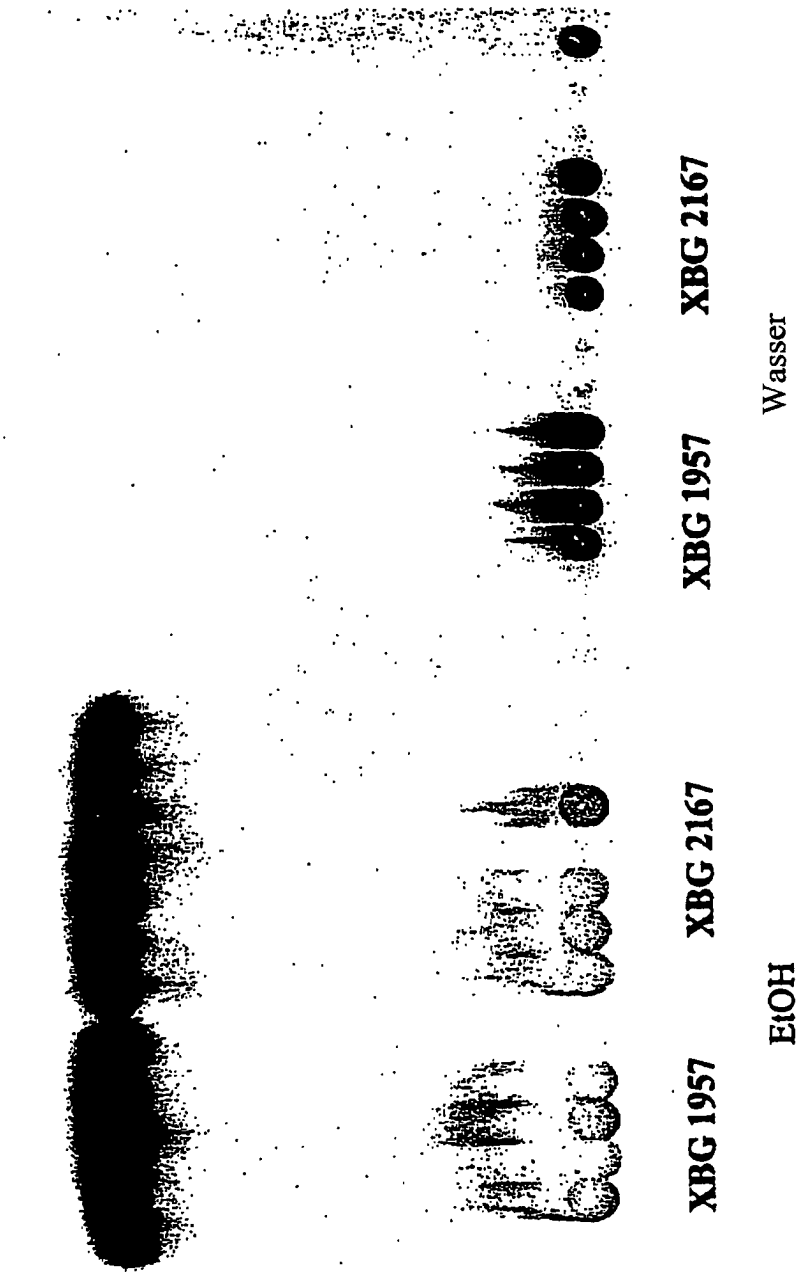
Anhängende Zeichnungen



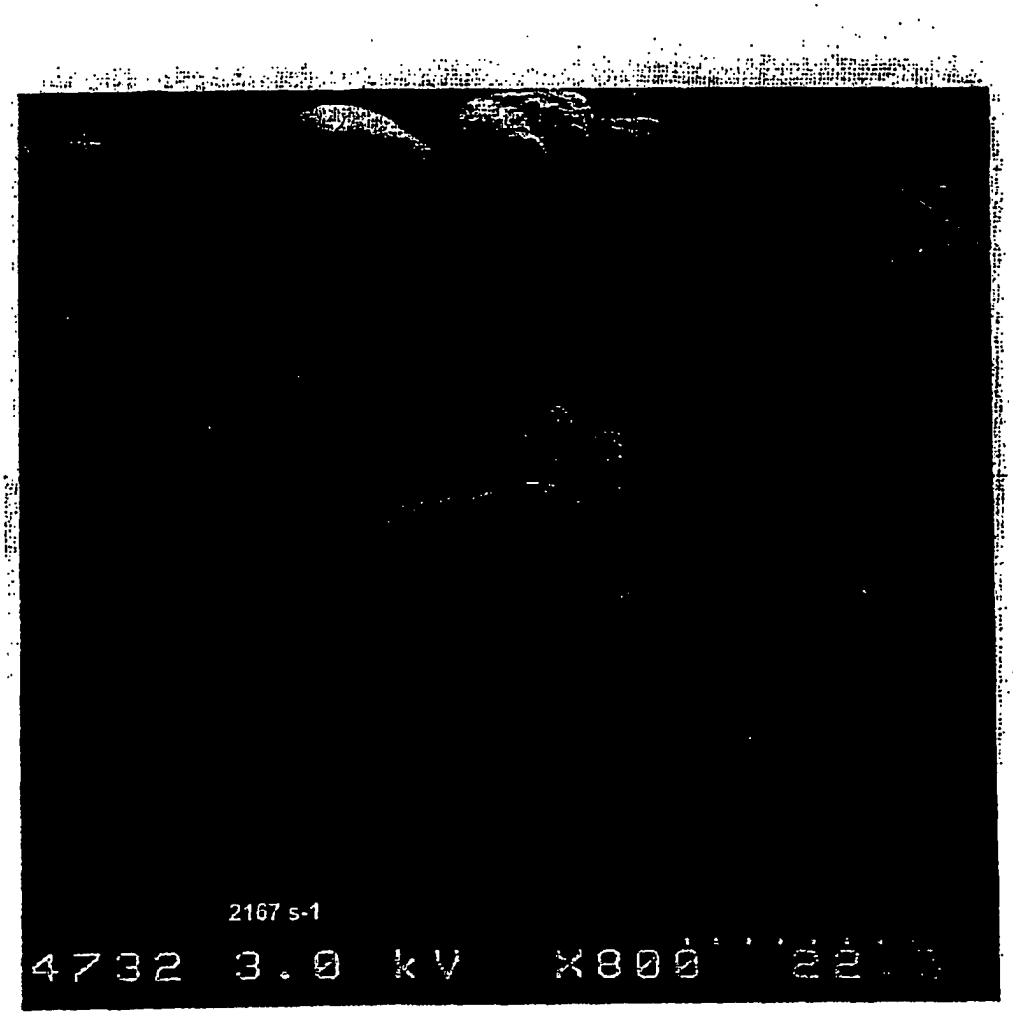
Figur 1


FOS/Samen (mg)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
XAW281
XAW289
XAW259
XAW272
XAW262
XAW291
XAW270
XAW352
XAW288
XAW256

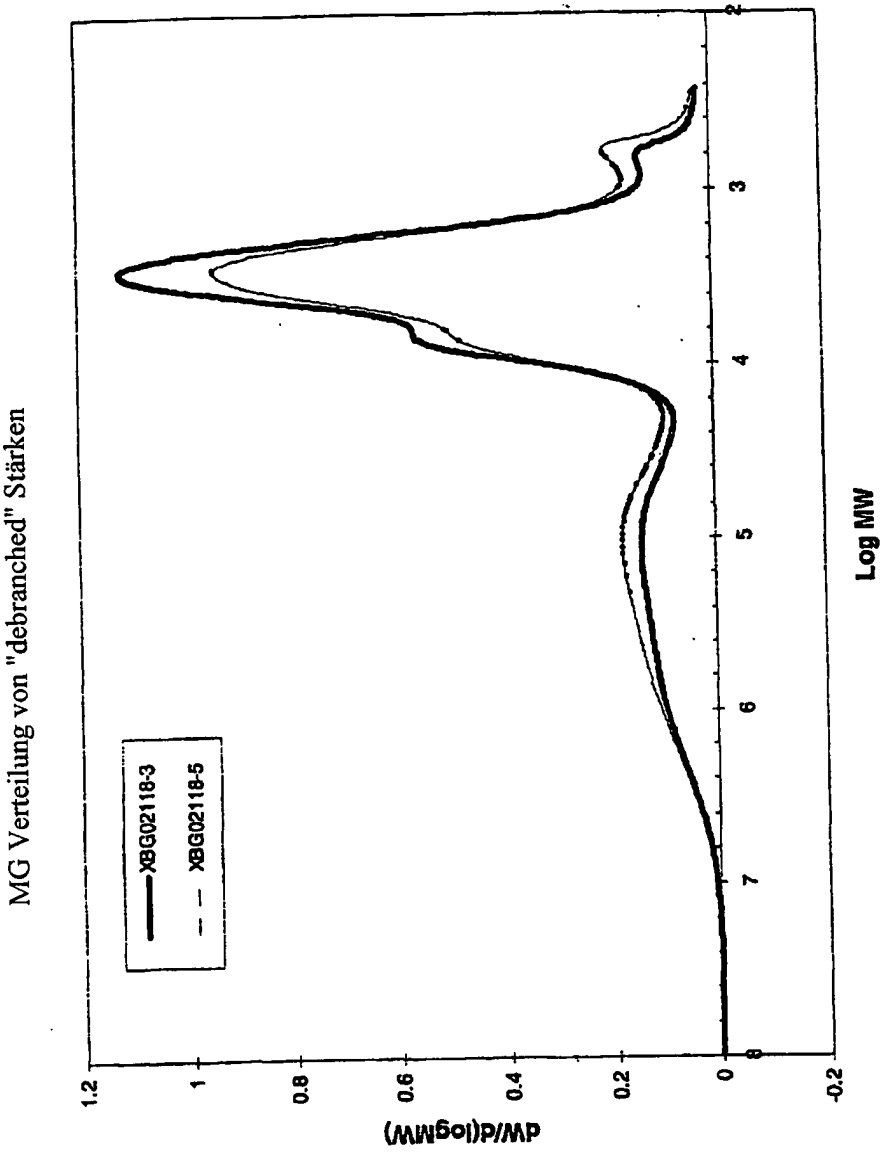
Figur 2



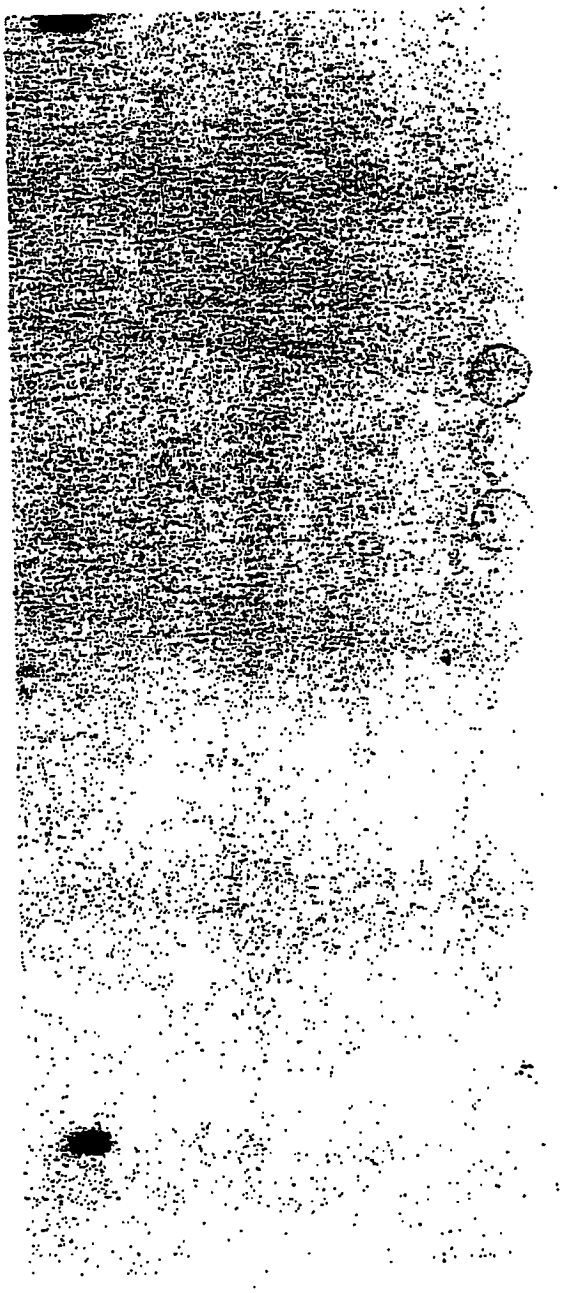
Figur 3



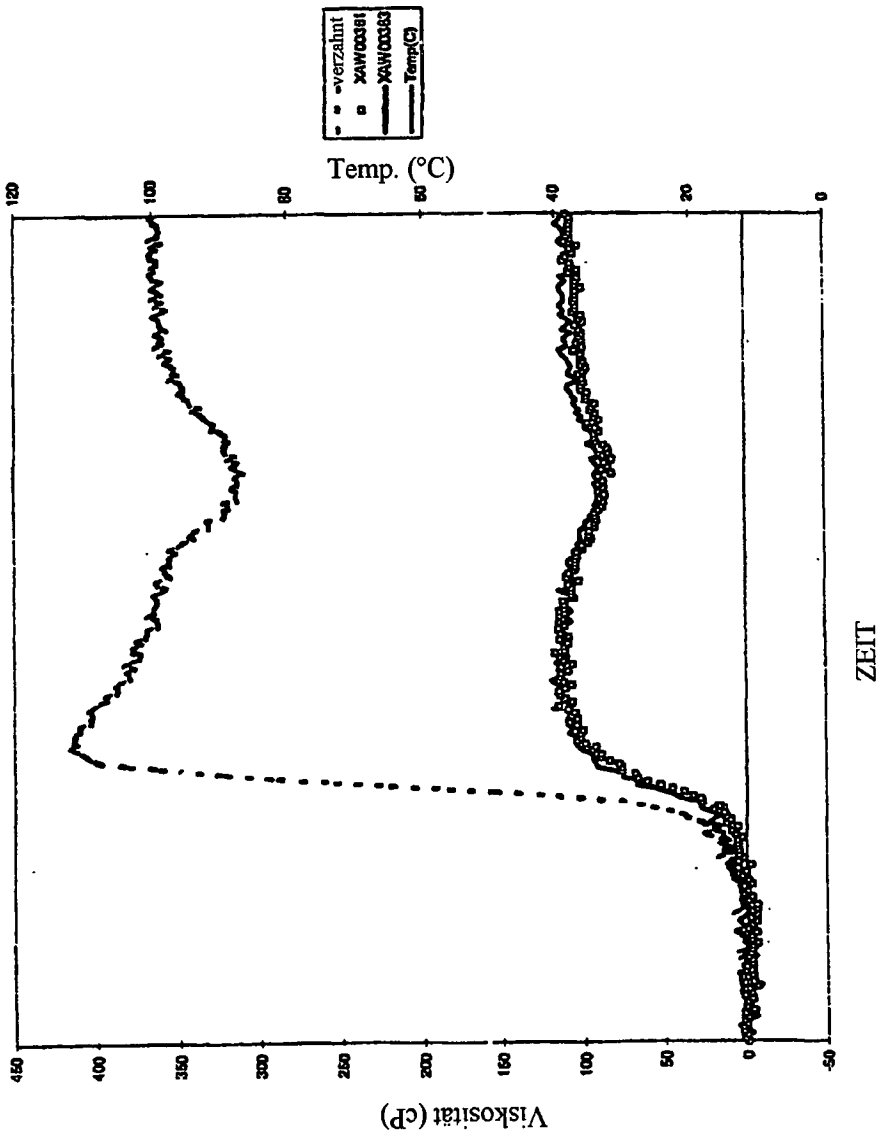
Figur 4


MG Verteilung von "debranched" Stärken
XBG02118-3
XBG02118-5
dW/d(logMW)
Log MW
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
-0.2
2
3
4
5
6
7
8

Figur 5



Figur 6


verzahnt
XAW00381
XAW00383
Temp(C)
Temp. (°C)
120
100
80
60
40
20
0
ZEIT
Viskosität (cP)
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
-50

Figur 7