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

(10) **DE 697 37 448 T2** 2007.11.15

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 907 741 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 37 448.3**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP97/02793**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 925 013.1**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1997/045545**
(86) PCT-Anmeldetag: **28.05.1997**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **04.12.1997**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.04.1999**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **07.03.2007**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **15.11.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 15/54*** (2006.01)
***C12N 15/82*** (2006.01)
***C12N 15/11*** (2006.01)
***C12N 9/10*** (2006.01)
***C12N 5/10*** (2006.01)
***C08B 30/00*** (2006.01)
***A01H 5/00*** (2006.01)
***A23L 1/0522*** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

| | | |
|---|---|---|
| **19621588** | **29.05.1996** | **DE** |
| **19636917** | **11.09.1996** | **DE** |

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

(73) Patentinhaber:
**Bayer CropScience AG, 40789 Monheim, DE**

(74) Vertreter:
**Vossius & Partner, 81675 München**

(72) Erfinder:
**STELLBRINK, Martina, D-80538 München, DE; LÖRZ, Horst, D-22589 Hamburg, DE; LÜTTICKE, Stephanie, D-20099 Hamburg, DE; WALTER, Lennart, 25348 Engelbrechtsche Wildnis, DE; FROHBERG, Claus, D-14532 Kleinmachnow, DE; KOSSMANN, Jens, Somerset West 7130, ZA**

(54) Bezeichnung: **NUKLEINSÄUREMOLEKÜLE, DIE FÜR ENZYME AUS WEIZEN KODIEREN, WELCHE AN DER STÄRKESYNTHESE BETEILIGT SIND**

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

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

## Beschreibung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung beschreibt Nucleinsäuremoleküle, die Enzyme aus Weizen codieren, welche an der Stärkesynthese von Pflanzen beteiligt sind. Diese Enzyme sind Isotypen der Stärkesynthase.

**[0002]** Die Erfindung beschreibt weiterhin Vektoren und Bakterien, die diese Nucleinsäuremoleküle enthalten. Die vorliegende Erfindung betrifft Weizenpflanzenzellen und mit den beschriebenen Nucleinsäuremolekülen transformierte Weizenpflanzen, bei denen die Aktivität der codierten Stärkesynthase reduziert ist.

**[0003]** Weiterhin werden Verfahren für die Produktion von transgenen Weizenpflanzen beschrieben, die wegen der Integration von DNA-Molekülen, die Stärkesynthase von Weizen codieren, Stärke synthetisieren, die in ihren Eigenschaften modifiziert ist.

**[0004]** Hinsichtlich ihrer wachsenden Bedeutung, die kürzlich pflanzlichen Substanzen als regenerativen Quellen von Rohstoffen zugeschrieben wurde, ist es eine Aufgabe der biotechnologischen Forschung zu versuchen, das pflanzliche Rohmaterial den Bedürfnissen der verarbeitenden Industrie anzupassen. Um die Verwendung von modifizierten, regenerativen Rohstoffen in so vielen Gebieten wie möglich zu ermöglichen, ist es weiterhin wichtig, eine große Vielzahl von Substanzen zu erhalten. Neben Ölen, Fetten und Proteinen stellen Polysaccharide den wesentlichen regenerativen Rohstoff dar, der von Pflanzen abgeleitet ist. Neben Cellulose nimmt Stärke eine wichtige Position unter den Polysacchariden ein, da sie eine der wichtigsten Speichersubstanzen in höheren Pflanzen ist. Unter ihnen ist Weizen eine interessante Kulturpflanze, da er 20% der Gesamtmenge an Stärke erzeugt, die in der Europäischen Gemeinschaft produziert wird.

**[0005]** Das Polysaccharid Stärke ist ein Polymer, das aus chemisch homogenen Grundkomponenten aufgebaut ist, nämlich den Glucosemolekülen. Sie stellt jedoch ein hoch komplexes Gemisch von verschiedenen Typen von Molekülen dar, die sich untereinander hinsichtlich ihres Polymerisationsgrads und des Verzweigungsgrads der Glucoseketten unterscheiden. Deshalb ist Stärke nicht ein homogener Rohstoff. Man unterscheidet insbesondere zwischen Amylose-Stärke, einem grundsätzlich nicht verzweigten Polymer, das aus α-1,4-glycosidisch verzweigten Glucosemolekülen aufgebaut ist, und Amylopectin-Stärke, die wiederum ein komplexes Gemisch aus verschiedenen, verzweigten Glucoseketten ist. Die Verzweigung ist das Resultat von zusätzlichen α-1,6-glycosidischen Verknüpfungen. Bei Weizen besteht die synthetisierte Stärke in Abhängigkeit von der Sorte aus etwa 11–37% Amylose-Stärke.

**[0006]** Um eine weitestmögliche Verwendung von Stärke zu ermöglichen, scheint es wünschenswert, daß Pflanzen bereitgestellt werden, die in der Lage sind, modifizierte Stärke zu synthetisieren, die für die verschiedenen Verwendungen besonders geeignet ist. Die Züchtung ist eine Möglichkeit, solche Pflanzen bereitzustellen. Dies stellt sich jedoch im Falle des Weizen wegen der polyploiden Eigenschaften von kultiviertem Weizen (tetra- und hexaploid) als sehr schwierig heraus. Erst kürzlich gelang es Wissenschaftlern "wächsernen" (keine Amylose enthaltenden) Weizen durch Kreuzzüchtung von Mutanten, die in der Natur vorkommen, zu produzieren (Nakamura et al., Mol. Gen. Genet. 248 (1995), 253–259). Eine andere Möglichkeit ist die spezifische genetische Modifikation des Stärkemetabolismus von Stärke produzierenden Pflanzen mittels rekombinanter DNA-Techniken. Eine Vorraussetzung dafür ist allerdings die Identifikation und Charakterisierung der Enzyme, die in die Stärkesynthese und/oder Stärkemodifikation involviert sind, ebenso wie die Isolierung der entsprechenden DNA-Moleküle, die diese Enzyme codieren.

**[0007]** Die biochemischen Reaktionswege, die zur Produktion von Stärke führen, sind grundsätzlich bekannt. Die Stärkesynthese in Pflanzenzellen findet in den Plastiden statt. In photosynthetisch aktivem Gewebe sind dies die Chloroplasten, in photosynthetische inaktivem, Stärke speicherndem Gewebe die Amyloplasten.

**[0008]** Die wichtigsten Enzyme, die in die Stärkesynthese involviert sind, sind die Stärkesynthasen ebenso wie Branching Enzymes. Im Falle der Stärkesynthasen werden verschiedene Isotypen beschrieben, die alle durch Übertragung eines Glucosylrests von ADP-Glucose auf α-1,4-Glucane eine Polymerisationsreaktion katalysieren. Branching Enzymes katalysieren die Einführung von α-1,6-Verzweigungen in lineare α-1,4-Glucane.

**[0009]** Die Stärkesynthasen können in zwei Gruppen aufgeteilt werden: die an Granula gebundenen Stärkesynthasen (GBSS) und die löslichen Stärkesynthasen (SSS). Diese Unterscheidung ist nicht immer offensichtlich, da einige Stärkesynthasen an Granula gebunden und auch löslich sind (Denyer et al., Plant J. 4 (1993), 191–198; Mu et al., Plant J. 6 (1994), 151–159). Innerhalb dieser Klassifikationen sind verschiedene Isotypen für verschiedene Pflanzenarten beschrieben. Diese Isotypen unterscheiden sich untereinander hinsichtlich ih-

rer Abhängigkeit von Primer-Molekülen (sog. "Primer-abhängige" (Typ II)- und "Primer-unabhängige" (Typ I)-Stärkesynthasen).

**[0010]** Bis jetzt wurde nur im Falle des Isotyps GBSS I ihre exakte Funktion während der Stärkesynthese erfolgreich bestimmt. Pflanzen, bei denen diese Enzymaktivität stark oder vollständig reduziert wurde, synthetisieren Stärke, die frei von Amylose ist (eine sog. "wächserne"-Stärke) (Shure et al., Cell 35 (1983), 225–233; Visser et al., Mol. Gen. Genet. 225 (1991), 289–296 ; WO 92/11376); deshalb wurde diesem Enzym eine entscheidende Rolle bei der Synthese von Amylose-Stärke zugewiesen. Dieses Phänomen wird auch in den Zellen der Grünalge Chlamydomonas reinhardtii beobachtet (Delrue et al., J. Bacteriol. 174 (1992), 3612–3620). Im Falle von Chlamydomonas wurde weiterhin gezeigt, daß GBSS I nicht nur in die Synthese von Amylose involviert ist, sondern auch auf die Synthese von Amylopectin einen Einfluß hat. Bei Mutanten, die keinerlei GBSS I-Aktivität zeigen, fehlt eine gewisse Fraktion des normalerweise synthetisierten Amylopectins, die langkettige Glucane zeigt.

**[0011]** Die Funktionen der anderen Isotypen der an Granula gebundenen Stärkesynthasen, insbesondere GBSS II, und der löslichen Stärkesynthasen sind bis jetzt nicht klar. Man nimmt an, daß lösliche Stärkesynthasen, zusammen mit Verzweigungsenzymen, in die Synthese von Amylopectin involviert sind (vgl. z.B. Ponstein et al., Plant Physiol. 92 (1990), 234–241) und daß sie bei der Regulierung der Stärkesyntheserate eine wichtige Rolle spielen.

**[0012]** Im Falle von Weizen wurden auf der Ebene der Proteine mindestens zwei Isotypen von an Granula gebundener Stärkesynthase (60 kDa und 100–105 kDa) und ein weiterer Isotyp, der möglicherweise eine lösliche Stärkesynthase darstellt (Denyer et al., Planta 196 (1995), 256–265; Rahman et al., Aust. J. Plant. Physiol. 22 (1995), 793–803), identifiziert. Die Existenz von mehreren SSS-Isotypen wurde bereits mittels chromatographischer Verfahren bewiesen (Rijven, Plant Physiol. 81 (1986) 448–453). Eine cDNA, die GBSS I aus Weizen codiert, wurde bereits beschrieben (Ainsworth et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 67–82).

**[0013]** Nucleinsäuresequenzen, die weitere Isotypen von Stärkesynthase aus Weizen codieren, sind noch unbekannt.

**[0014]** cDNA-Sequenzen, die andere Stärkesynthasen als GBSS I codieren, wurden bis jetzt nur aus Erbse (Dry et al., Plant J. 2 (1992), 193–202), Reis (Baba et al., Plant Physiol. 103 (1993) 565–573) und Kartoffeln (Edwards et al., Plant J. 8 (1995), 283–294) beschrieben.

**[0015]** Lösliche Stärkesynthasen wurden in mehreren anderen Pflanzenarten neben Weizen identifiziert. Lösliche Stärkesynthasen wurden zum Beispiel in homogener Form aus der Erbse (Denyer und Smith, Planta 186 (1992) 609–617) und Kartoffeln (Edwards et al., Plant J. 8 (1995), 283–294) isoliert. In diesen Fällen wurde gefunden, daß der Isotyp der löslichen Stärkesynthase, der als SSS II identifiziert wurde, identisch ist mit der an Granula gebundenen Stärkesynthase GBSS II (Denyer et al., Plant J. 4 (1993), 191–198; Edwards et al., Plant J. 8 (1995), 283–294). Im Falle anderer Pflanzenarten wurde die Existenz von mehreren SSS-Isotypen mittels chromatographischer Verfahren beschrieben, wie zum Beispiel im Falle von Gerste (Tyynelã und Schulman, Physiologia Plantarum 89 (1993) 835–841; Kreis, Planta 148 (1980), 412–416). Es wurden aber bis jetzt keine DNA-Sequenzen beschrieben, die diese Proteine codieren.

**[0016]** Die WO 96/15248 beschreibt Nucleotidsequenzen, die aus Kartoffel isoliert wurden und die verschiedene Arten von löslicher Stärkesynthase (als SSSA und SSSB bezeichnet) und GBSS II codieren.

**[0017]** Um weitere Möglichkeiten der Modifikation jeder gewünschten, Stärke speichernden Pflanze, insbesondere Weizen, auf eine solche Weise bereitzustellen, daß sie eine modifizierte Stärke synthetisiert, müssen die entsprechenden DNA-Sequenzen, die weitere Isotypen von Stärkesynthasen codieren, identifiziert werden.

**[0018]** Deshalb war die Aufgabe der vorliegenden Erfindung die Bereitstellung von Nucleinsäuremolekülen, die Enzyme codieren – insbesondere Enzyme aus Weizen -, die in die Stärkebiosynthese involviert sind, und mit deren Hilfe genetisch modifizierte Pflanzen produziert werden können, die eine reduzierte Aktivität dieser Enzyme zeigen, wodurch eine Modifikation der chemischen und/oder physikalischen Eigenschaften der in diesen Pflanzen synthetisierten Stärke bewirkt wird.

**[0019]** Diese Aufgabe wurde durch die Bereitstellung der Ausführungsformen erreicht, die in den Ansprüchen beschrieben sind.

**[0020]** Die vorliegende Erfindung offenbart Nucleinsäuremoleküle, die Proteine von Weizen mit der biologischen Aktivität einer löslichen Stärkesynthase codieren, wobei solche Moleküle vorzugsweise Proteine codieren, die die Aminosäuresequenz umfassen, die unter der Seq ID No. 2 dargestellt ist. Offenbart werden insbesondere Nucleinsäuremoleküle, die die gesamte oder einen Teil der Nucleotidsequenz umfassen, wie sie in Seq ID No. 1 erwähnt ist, vorzugsweise Moleküle, die die codierende Region, wie sie in Seq ID No. 1 angezeigt ist, oder je nachdem die entsprechenden Ribonucleotidsequenzen umfassen.

**[0021]** Die vorliegende Erfindung beschreibt weiterhin Nucleinsäuremoleküle, die lösliche Stärkesynthase aus Weizen codieren, die mit einem der vorstehend erwähnten Moleküle hybridisieren und die mehr als 90% Sequenzidentität mit der Nucleotidsequenz der Nucleotide 186 bis 2239 von Seq ID No. 1 zeigen.

**[0022]** Nucleinsäuremoleküle, die lösliche Stärkesynthase aus Weizen codieren und deren Sequenz wegen der Degenerierung des genetischen Codes unterschiedlich ist zu der Nucleotidsequenz der vorstehend erwähnten Moleküle, werden ebenfalls beschrieben.

**[0023]** Die vorliegenden Erfindung beschreibt auch Nucleinsäuremoleküle, die eine Sequenz zeigen, die zu der gesamten oder einem Teil der vorstehend erwähnten Sequenzen komplementär ist.

**[0024]** Die Proteine, die von den vorstehend beschriebenen Nucleinsäuremolekülen codiert werden, sind lösliche Stärkesynthasen, die von Weizen abgeleitet sind. Diese Proteine zeigen gewisse homologe Regionen mit den bisher bekannten löslichen Stärkesynthasen von anderen Pflanzenarten.

**[0025]** Die beschriebenen Nucleinsäuremoleküle können DNA- ebenso wie RNA-Moleküle sein. Die entsprechenden DNA-Moleküle sind zum Beispiel genomische oder cDNA-Moleküle. Die Nucleinsäuremoleküle können aus natürlichen Quellen isoliert werden oder mittels bekannter Verfahren synthetisiert werden.

**[0026]** In dieser Erfindung bedeutet der Ausdruck "Hybridisierung" eine Hybridisierung unter herkömmlichen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen, wie zum Beispiel beschrieben in Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2te Auflage (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

**[0027]** Die Nucleinsäuremoleküle, die mit den vorstehend beschriebenen Molekülen hybridisieren, können z.B. aus genomischen oder aus cDNA-Bibliotheken isoliert werden, die aus Weizengewebe produziert wurden.

**[0028]** Somit können die Identifizierung und Isolierung solcher Nucleinsäuremoleküle unter Verwendung der vorstehend beschriebenen Moleküle oder von Teilen dieser Moleküle oder je nachdem der reversen komplementären Stränge dieser Moleküle z.B. durch Hybridisierung gemäß Standardverfahren stattfinden (vgl. z.B. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2te Auflage Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

**[0029]** Als Sonde bei der Hybridisierung können z.B. Nucleinsäuremoleküle verwendet werden, die exakt oder im Wesentlichen die Nucleotidsequenzen enthalten, die unter Seq ID No. 1 dargestellt sind, oder Teile davon. Die Fragmente, die als Sonde bei der Hybridisierung verwendet werden, können auch synthetische Fragmente sein, die mittels herkömmlicher Syntheseverfahren produziert wurden und deren Sequenz grundsätzlich identisch ist mit der der Nucleinsäuremoleküle, wie sie vorstehend beschrieben wurden. Nach der Identifizierung und Isolierung der Gene, die mit den vorstehend beschriebenen Nucleinsäuresequenzen hybridisieren, muß die Sequenz bestimmt werden und die Eigenschaften der Proteine, die durch diese Sequenzen codiert werden, müssen analysiert werden.

**[0030]** Die Moleküle, die mit vorstehend beschriebenen Nucleinsäuremolekülen hybridisieren, umfassen auch Fragmente, Derivate und allelische Varianten der vorstehend beschriebenen Nucleinsäuremoleküle, die ein Protein aus Weizen codieren, wie in der Erfindung beschrieben. Dabei werden Fragmente als Teile der Nucleinsäuremoleküle definiert, die lang genug sind, um eines der beschriebenen Proteine zu codieren. Dies umfaßt auch Teile der vorstehend beschriebenen Nucleinsäuremoleküle, denen die Nucleotidsequenz fehlt, die das Signalpeptid codiert, das für den Transport des Proteins in das Plastid verantwortlich ist. Solche Fragmente sind zum Beispiel die Nucleotidsequenz, die die Aminosäurereste 34 bis 671 codiert, wie in Seq ID No. 2 gezeigt.

**[0031]** Darüber hinaus sind Fragmente, die bei der vorliegenden Erfindung besonders bevorzugt sind, die Fragmente, die die Nucleotide 186 bis 2239 der Seq ID No. 1 umfassen, ebenso wie die Fragmente, die einen

zusätzlichen G-Rest an ihrem 5'-Ende umfassen.

**[0032]** In diesem Kontext bedeutet der Ausdruck Derivate, daß die Sequenzen dieser Moleküle sich von den Sequenzen der vorstehend erwähnten Nucleinsäuremoleküle an einer oder mehreren Positionen unterscheiden und daß sie ein hohes Maß an Homologie mit diesen Sequenzen zeigen. Dabei bedeutet Homologie eine Sequenzidentität von mehr als 90%. Die Abweichungen, die im Vergleich mit den vorstehend beschriebenen Nucleinsäuremolekülen auftreten, können durch Deletion, Substitution, Insertion oder Rekombination verursacht sein.

**[0033]** Darüber hinaus bedeutet Homologie, daß zwischen den entsprechenden Nucleinsäuremolekülen oder den Proteinen, die sie codieren, funktionelle und/oder strukturelle Äquivalenz bestehen. Die Nucleinsäuremoleküle, die zu den vorstehend beschriebenen Molekülen homolog sind und Derivate diese Moleküle darstellen, sind im allgemeinen Variationen dieser Moleküle, die Modifikationen darstellen, die dieselbe biologische Funktion ergeben. Diese Variationen können natürlicherweise vorkommende Variationen sein, zum Beispiel Sequenzen, die aus anderen Organismen abgeleitet sind, oder Mutationen, wobei diese Mutationen natürlicherweise aufgetreten sein können oder mittels spezifischer Mutagenese eingeführt werden können. Darüber hinaus können die Variationen synthetisch produzierte Sequenzen sein. Die allelischen Varianten können natürlicherweise vorkommend sein ebenso wie synthetisch produzierte Varianten oder Varianten, die mittels rekombinanter DNA-Techniken produziert wurden.

**[0034]** Die Proteine, die durch die verschiedenen Varianten der vorstehend beschriebenen Nucleinsäuremoleküle codiert werden, zeigen gewisse gemeinsame Charakteristika. Die Enzymaktivität, das Molekulargewicht, die immunologische Reaktivität, die Konformation usw. können zu diesen Charakteristika gehören, ebenso wie physikalische Eigenschaften wie die Mobilität bei der Gelelektrophorese, chromatographische Charakteristika, Sedimentationskoeffizienten, die Löslichkeit, spektroskopische Eigenschaften, die Stabilität, das pH-Optimum, das Temperaturoptimum usw.. Signifikante Charakteristika einer Stärkesynthase sind: i) ihre Lage im Stroma der Plastiden von Pflanzenzellen; ii) ihre Fähigkeit zur Synthese von linearen α-1,4-verknüpften Polyglucanen unter Verwendung von ADP-Glucose als Substrat. Diese Aktivität kann so bestimmt werden, wie es bei Denyer und Smith (Planta, 186 (1992), 606–617) gezeigt oder in den Beispielen beschrieben wird.

**[0035]** Darüber hinaus beschreibt die Erfindung Vektoren, insbesondere Plasmide, Cosmide, Viren, Bakteriophagen und andere Vektoren, die in der Gentechnik gebräuchlich sind und die die vorstehend erwähnten Nucleinsäuremoleküle enthalten.

**[0036]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform sind die in den Vektoren enthaltenen Nucleinsäuremoleküle mit regulatorischen Elementen verknüpft, die die Transkription und Synthese einer translatierbaren RNA in prokaryontischen und eukaryontischen Zellen sicherstellen.

**[0037]** Die Expression der vorstehend beschriebenen Nucleinsäuremoleküle in prokaryontischen Zellen, z.B. in Escherichia coli, ist insofern interessant, als dies eine präzisere Charakterisierung der enzymatischen Aktivitäten der Enzyme ermöglicht, die durch diese Moleküle codiert werden. Insbesondere ist es möglich, das Produkt zu charakterisieren, das von den jeweiligen Enzymen in Abwesenheit von anderen Enzymen synthetisiert wird, die in die Stärkesynthese der Pflanzenzelle involviert sind. Dies macht es möglich, Rückschlüsse über die Funktion zu ziehen, die das jeweilige Protein während der Stärkesynthese in der Pflanzenzelle ausübt.

**[0038]** Darüber hinaus ist es möglich, mittels herkömmlicher molekularbiologischer Techniken (vgl. z.B. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2te Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) verschiedene Mutationen in die beschriebenen Nucleinsäuremoleküle einzuführen, womit die Synthese von Proteinen mit möglicherweise modifizierten biologischen Eigenschaften induziert wird. Damit ist es einerseits möglich, Deletionsmutanten zu produzieren, bei denen Nucleinsäuremoleküle durch fortlaufende Deletionen am 5'- oder 3'-Ende der codierenden DNA-Sequenz produziert werden. Diese Nucleinsäuremoleküle können zur Synthese von entsprechend verkürzten Proteinen führen. Solche Deletionen am 5'-Ende der Nucleotidsequenz machen es zum Beispiel möglich, die Aminosäuresequenzen zu identifizieren, die für den Transport des Enzyms in die Plastiden verantwortlich sind (Transitpeptide). Dies erlaubt die spezifische Produktion von Enzymen, die wegen der Entfernung der entsprechenden Sequenzen nicht mehr in den Plastiden lokalisiert sind, sondern im Cytosol, oder die wegen der Hinzufügung von anderen Signalsequenzen in anderen Kompartimenten lokalisiert sind.

**[0039]** Andererseits könnten auch Punktmutationen an Positionen eingeführt werden, wo eine Modifikation der Aminosäuresequenz zum Beispiel die Enzymaktivität oder die Regulation des Enzyms beeinflußt. Auf die-

sem Weg können zum Beispiel Mutanten mit einem modifizierten $K_m$-Wert produziert werden, oder Mutanten, die nicht mehr den Regulationsmechanismen durch allosterische Regulation oder der kovalenten Modifikation unterliegen, die üblicherweise in Zellen auftreten.

**[0040]** Darüber hinaus können Mutanten, die eine modifizierte Substrat- oder Produktspezifität zeigen, produziert werden, wie Mutanten, die ADP-Glucose-6-Phosphat statt ADP-Glucose als Substrat verwenden. Darüber hinaus können Mutanten mit einem modifizierten Aktivitäts-Temperatur-Profil produziert werden.

**[0041]** Für die genetische Manipulation in prokaryontischen Zellen können die vorstehend beschriebenen Nucleinsäuremoleküle oder Teile dieser Moleküle in Plasmide integriert werden, die eine Mutagenese oder eine Sequenzmodifikation durch Rekombination von DNA-Sequenzen erlauben. Mittels Standardverfahren (vgl. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A laboratory manual, 2te Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA) können Basenaustäusche durchgeführt oder natürliche oder synthetische Sequenzen hinzugefügt werden. Um die DNA-Fragmente zu verbinden, können Adaptoren oder Linker an die Fragmente gebunden werden. Darüber hinaus können Manipulationen verwendet werden, die geeignete Restriktionsstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsstellen entfernen. Wo auch immer Inseriertionen, Deletionen oder Substitutionen verwendet werden, kann die in vitro-Mutagenese, die "Primerreparatur", die Restriktion oder die Ligierung verwendet werden. Für die Analyse werden üblicherweise die Sequenzanalyse, eine Restriktionanalyse und weitere biochemische-molekularbiologische Verfahren verwendet.

**[0042]** Die Erfindung beschreibt auch Wirtszellen, insbesondere prokaryontische oder eukaryontische Zellen, die mit einem vorstehend erwähnten Nucleinsäuremolekül oder mit einem vorstehend beschriebenen Vektor transformiert und/oder genetisch modifiziert wurden, ebenso wie Zellen, die von Zellen abgeleitet wurden, die auf eine solche Weise transformiert und/oder genetisch modifiziert wurden und ein Nucleinsäuremolekül oder einen Vektor, wie vorstehend beschrieben, enthalten. Dies ist vorzugsweise eine Bakterienzelle oder eine Pflanzenzelle. Solche Zellen sind dadurch charakterisiert, daß das vorstehend beschriebene eingebrachte Nucleinsäuremolekül bezüglich der transformierten Zelle heterolog ist, d.h. es kommt in diesen Zellen nicht natürlicherweise vor, oder es ist im Genom an einem anderen Platz als die entsprechende, natürlicherweise vorkommende Sequenz lokalisiert. Darüber hinaus beschreibt die vorliegenden Erfindung die Proteine, die die vorstehend beschriebenen Nucleinsäuremoleküle codieren, ebenso wie Verfahren für ihre Produktion, wobei eine vorstehend beschriebene Wirtszelle unter Bedingungen gezüchtet wird, die die Synthese des Proteins erlauben, und wobei das Protein dann aus den gezüchteten Zellen und/oder dem Kulturmedium isoliert wird.

**[0043]** Die vorliegenden Erfindung beschreibt auch transgene Pflanzenzellen, die mit einem oder mehreren der vorstehend beschriebenen Nucleinsäuremoleküle transformiert wurden. Solche Zellen enthalten ein oder mehrere Nucleinsäuremoleküle, wobei dieses/diese vorzugsweise mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft ist/sind, die die Transkription in Pflanzenzellen sicherstellen, insbesondere mit einem Promotor. Solche Zellen unterscheiden sich von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen dadurch, daß sie mindestens ein Nucleinsäuremolekül der Erfindung enthalten, das natürlicherweise in solchen Zellen nicht vorkommt, oder dadurch, daß ein solches Molekül an einer Position im Genom der Zelle vorkommt, an der es natürlicherweise nicht vorkommt, d.h. in einer unterschiedlichen genomischen Umgebung.

**[0044]** Mittels Verfahren, die dem Durchschnittsfachmann auf dem Fachgebiet bekannt sind, können die transgenen Pflanzenzellen zu ganzen Pflanzen regeneriert werden. Somit beschreibt die vorliegenden Erfindung auch Pflanzen, die durch Regenerierung der vorstehend beschriebenen transgenen Pflanzenzellen erhalten wurden, und Pflanzen, welche die vorstehend beschriebenen transgenen Pflanzenzellen enthalten. Die transgenen Pflanzen können im Prinzip Pflanzen jeder gewünschten Art sein, d.h. sie können einkeimblättrige ebenso wie zweikeimblättrige Pflanzen sein. Diese sind vorzugsweise Nutzpflanzen, insbesondere Stärke synthetisierende oder Stärke speichernde Pflanzen wie Getreide (Roggen, Gerste, Hafer, Weizen usw.) Reis, Mais, Erbsen, Cassava oder Kartoffeln.

**[0045]** Durch Bereitstellung der vorstehend beschriebenen Nucleinsäuremoleküle ist es nun möglich – mittels rekombinanter DNA-Techniken – auf eine Weise spezifisch in den Stärkemetabolismus von Pflanzen einzugreifen, insbesondere Weizenpflanzen, wie sie bisher mittels Züchtung nicht möglich war. Damit kann der Stärkemetabolismus auf eine Weise modifiziert werden, daß eine modifizierte Stärke synthetisiert wird, die im Vergleich mit der Stärke, die in Wildtyppflanzen synthetisiert wird, z.B. hinsichtlich ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften modifiziert ist, insbesondere des Verhältnisses Amylose/Amylopectin, des Ausmaßes an Verzweigung, der durchschnittlichen Kettenlänge, des Phosphatgehalts, des Verhaltens bei der Pastenbildung, der Größe und/oder der Form der Stärkekörnchen. Es besteht die Möglichkeit der Erhöhung der Ausbeute der genetisch modifizierten Pflanzen durch Erhöhung der Aktivität der in der Erfindung beschriebenen Proteine,

z.B. durch Überexpression der entsprechenden Nucleinsäuremoleküle oder durch Bereitstellung von Mutanten, die nicht mehr den zellspezifischen Regulationsschemata und/oder verschiedenen Temperaturabhängigkeiten bezüglich ihrer Aktivität unterliegen. Die ökonomische Bedeutung der Möglichkeit der Beeinflussung der Stärkesynthese von Weizen ist offensichtlich, da diese Pflanze beträchtliche Mengen an Stärke produziert.

**[0046]** Es ist daher möglich, die vorstehend beschriebenen Nucleinsäuremoleküle in Pflanzenzellen zu exprimieren, um die Aktivität der jeweiligen Stärkesynthasen zu erhöhen, oder es ist möglich, sie in Zellen einzubringen, die üblicherweise das besagte Enzym nicht exprimieren. Darüber hinaus können die beschriebenen Nucleinsäuremoleküle mittels Verfahren modifiziert werden, die dem Durchschnittsfachmann auf dem Fachgebiet bekannt sind, um Stärkesynthasen zu produzieren, die nicht mehr den zellspezifischen Regulationsschemata unterliegen oder modifizierte Temperaturabhängigkeiten oder Substrat- bzw. Produktspezifitäten zeigen.

**[0047]** Bei der Expression der vorstehend beschriebenen Nucleinsäuremoleküle in Pflanzen können die synthetisierten Proteine im Prinzip in jedem gewünschten Kompartiment innerhalb der Pflanzenzelle lokalisiert sein. Um sie innerhalb eines spezifischen Kompartiments zu lokalisieren, muß die Sequenz, die die Lokalisierung in den Plastiden sicherstellt, deletiert werden und die verbleibenden codierenden Regionen müssen gegebenenfalls mit DNA-Sequenzen verknüpft werden, die die Lokalisierung in dem jeweiligen Kompartiment sicherstellt. Solche Sequenzen sind bekannt (vgl. z.B. Braun et al., EMBO J. 11 (1992), 3219–3227; Wolter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 846–850; Sonnewald et al., Plant J. 1 (1991), 95–106).

**[0048]** Die Erfindung beschreibt auch Vermehrungsmaterial der beschriebenen Pflanzen, d.h. Früchte, Samen, Knollen, Wurzelstöcke, Sämlinge, Schnitte, Calli, Zellkulturen, usw. Die Stärke kann aus den transgenen Pflanzenzellen, den Pflanzen ebenso wie aus dem Vermehrungsmaterial gewonnen werden.

**[0049]** Wegen der Expression oder je nachdem der zusätzlichen Expression von mindestens einem der vorstehend beschriebenen Nucleinsäuremoleküle synthetisieren die transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen, die in der Erfindung beschrieben werden, eine Stärke, die im Vergleich mit der Stärke, die in der Wildtyppflanze synthetisiert wird, modifiziert ist, zum Beispiel hinsichtlich ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften, insbesondere des Verhältnisses Amylose/Amylopectin, des Ausmaßes an Verzweigung, der durchschnittlichen Kettenlänge, des Phosphatgehalts, des Verhaltens bei der Pastenbildung, der Größe und/oder der Form der Stärkekörnchen. Im Vergleich mit Wildtypstärke kann eine solche Stärke insbesondere hinsichtlich ihrer Viskosität und/oder der Gelbildungseigenschaften der Klebstoffe dieser Stärke modifiziert sein.

**[0050]** Die vorliegenden Erfindung betrifft auch transgene Weizenpflanzenzellen, bei denen die Aktivität eines Proteins reduziert ist, wobei das besagte Protein von einem Nucleinsäuremolekül codiert wird, das eine Stärkesynthase aus Weizen codiert, ausgewählt aus der Gruppe, die besteht aus

(a) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, das die Aminosäuresequenz der Reste 62 bis 671, wie in SEQ ID NO: 2 gezeigt, umfaßt;

(b) Nucleinsäuremolekülen, umfassend die Nucleotidsequenz der Nucleotide 186 bis 2239, wie in SEQ ID NO: 1 gezeigt, oder eine entsprechende Ribonucleotidsequenz;

(c) Nucleinsäuremolekülen, deren Sequenz eine Sequenzidentität von mehr als 90% zu der Nucleotidsequenz der Nucleotide 186 bis 2239, wie in SEQ ID NO: 1 gezeigt, hat und die eine lösliche Stärkesynthase codieren; und

(d) Nucleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz durch die Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der Nucleinsäuremoleküle, aufgeführt unter (c), abweicht.

**[0051]** Mit den erwähnten Nucleinsäuremolekülen ist es möglich, Weizenpflanzenzellen und Weizenpflanzen zu produzieren, bei denen die Aktivität eines Proteins, das von einem solchen Nucleinsäuremolekül codiert wird, reduziert ist. Dies führt auch zur Synthese von Stärke mit modifizierten chemischen und/oder physikalischen Eigenschaften im Vergleich mit der Stärke von Wildtyppflanzenzellen. Die Produktion von Weizenpflanzenzellen mit einer reduzierten Aktivität eines Proteins, wie vorstehend beschrieben, kann zum Beispiel durch die Expression von mindestens einer entsprechenden Antisense-RNA, von mindestens einer Sense-RNA zum Erzielen eines Cosuppressions-Effektes oder durch die Expression von mindestens einem entsprechend konstruierten Ribozym, welches spezifisch Transkripte spaltet, die das vorstehend beschriebene Protein codieren, unter Verwendung der vorstehend erwähnten Nucleinsäuremoleküle erreicht werden.

**[0052]** Um eine Antisense-RNA zu exprimieren, können einerseits DNA-Moleküle verwendet werden, die die vollständige Sequenz umfassen, die ein vorstehend beschriebenes Protein codiert, möglicherweise einschließlich existierender flankierender Sequenzen, ebenso wie DNA-Moleküle, die nur Teile der codierenden Sequenz umfassen, wobei diese Teile lang genug sein müssen, um innerhalb der Zellen einen Antisense-Effekt zu be-

wirken. Grundsätzlich können Sequenzen mit einer minimalen Länge von 15 bp, vorzugsweise mit einer Länge von 100–500 bp und für eine effiziente Antisense-Inhibierung insbesondere Sequenzen mit einer Länge von mehr als 500 bp verwendet werden. Im Allgemeinen werden DNA-Moleküle verwendet, die kürzer sind als 5000 bp, vorzugsweise Sequenzen mit einer Länge von weniger als 2500 bp.

**[0053]** Es können auch DNA-Sequenzen verwendet werden, die hoch homolog, aber nicht vollständig identisch mit den Sequenzen der vorstehend beschriebenen DNA-Moleküle sind. Die minimale Homologie sollte mehr als etwa 65% sein. Vorzugsweise sollten Sequenzen mit Homologien zwischen 95 und 100% verwendet werden.

**[0054]** Das Verfahren für die Reduktion der Aktivität eines vorstehend beschriebenen Proteins in Pflanzenzellen mittels eines Cosuppressions-Effektes ist dem Durchschnittsfachmann auf dem Fachgebiet bekannt und wurde zum Beispiel beschrieben in Jorgensen (Trends Biotechnol. 8 (1990), 340–344), Niebel et al., (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 91–103), Flavell et al., (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 43–46), Palaqui und Vaucheret (Plant. Mol. Biol. 29 (1995), 149–159), Vaucheret et al., (Mol. Gen. Genet. 248 (1995) 311–317), de Borne et al., (Mol. Gen. Genet. 243 (1994) 613–621) und in anderen Quellen.

**[0055]** Die Expression von entsprechenden Ribozymen zur Reduktion der Aktivität gewisser Enzyme in Zellen ist dem Durchschnittsfachmann auf dem Fachgebiet ebenfalls bekannt und zum Beispiel beschrieben in der EP-B1 0 321 201. Die Expression von Ribozymen in Pflanzenzellen wurde z.B. beschreiben von Feyter et al., (Mol. Gen. Genet. 250 (1996) 329–338).

**[0056]** Darüber hinaus sind auch Weizenpflanzen, die die vorstehend beschriebenen transgenen Weizenpflanzenzellen der Erfindung enthalten, Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Diese können aus den Weizenpflanzenzellen der Erfindung mittels Verfahren, die dem Durchschnittsfachmann auf dem Fachgebiet bekannt sind, zu ganzen Pflanzen regeneriert werden.

**[0057]** Die Erfindung betrifft auch Vermehrungsmaterial der Weizenpflanzen der Erfindung, insbesondere Samen, Sämlinge, Schnitte, Calli, Zellkulturen usw. Darüber hinaus wird auch die Stärke beschrieben, die von den vorstehend erwähnten transgenen Pflanzenzellen, Pflanzen ebenso wie dem Vermehrungsmaterial abgeleitet ist.

**[0058]** Wegen der Reduktion der Aktivität eines Proteins, das von einem vorstehend erwähnten Nucleinsäuremolekül codiert wird, synthetisieren die transgenen Weizenpflanzenzellen und Weizenpflanzen der Erfindung eine Stärke, die im Vergleich mit der Stärke, die von Wildtyppflanzen synthetisiert wird, hinsichtlich ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften modifiziert ist, insbesondere des Verhältnisses Amylose/Amylopectin, des Verzweigungsgrads, der durchschnittlichen Kettenlänge, des Phosphatgehalts, des Verhaltens bei der Pastenbildung, der Größe und/oder der Form der Stärkekörnchen. Diese Stärke kann zum Beispiel modifizierte Viskositäten und/oder Gelbildungseigenschaften ihrer Klebstoffe im Vergleich mit Stärke zeigen, die von Wildtyppflanzen abgeleitet ist.

**[0059]** Die beschriebenen Stärken können gemäß Techniken, die dem Durchschnittsfachmann auf dem Fachgebiet bekannt sind, modifiziert werden; in nicht modifizierter ebenso wie in modifizierter Form sind sie geeignet für die Verwendung bei Lebensmitteln oder für die Verwendung bei nicht-Lebensmitteln.

**[0060]** Grundsätzlich können die Möglichkeiten der Verwendung von Stärke in zwei größerer Gebiete aufgeteilt werden. Ein Gebiet umfaßt die Hydrolyseprodukte von Stärke, im Wesentlichen Glucose und Glucankomponenten, die durch enzymatische oder chemische Prozesse erhalten werden. Sie können als Ausgangsmaterial für weitere chemische Modifikationen und Prozesse verwendet werden, wie die Fermentation. In diesem Kontext könnte es von Bedeutung sein, daß der Hydrolyseprozeß einfach und billig durchgeführt werden kann. Gegenwärtig wird er im Wesentlichen enzymatisch unter Verwendung von Amyloglucosidase durchgeführt. Es ist denkbar, daß die Kosten durch Verwendung niedriger Mengen an Enzymen für die Hydrolyse wegen Veränderungen bei der Struktur der Stärke reduziert werden könnten, z.B. der Vergrößerung der Oberfläche des Korns, der Verbesserung der Abbaufähigkeit wegen geringerer Verzweigung oder einer sterischen Struktur, die den Zugang der verwendeten Enzyme beschränkt.

**[0061]** Das andere Gebiet, in dem Stärke wegen ihrer Polymerstruktur als sogenannte native Stärke verwendet wird, kann in zwei weitere Gebiete unterteilt werden:

1. Verwendung in Lebensmitteln

**[0062]** Stärke ist ein klassisches Additiv für verschiedene Lebensmittel, bei denen sie im Wesentlichen dem Zweck der Bindung von wäßrigen Additiven dient und/oder eine erhöhte Viskosität oder eine erhöhte Gelbildung verursacht. Wichtige charakteristische Eigenschaften sind das Fluß- und Sorptionsverhalten, Schwell- und Pastenbildungstemperatur, Viskosität und Verdickungsleistung, Löslichkeit der Stärke, Transparenz und Pastenstruktur, Hitze-, Scher- und Säureresistenz, Tendenz zur Retrogradation, Fähigkeit zur Filmbildung, Resistenz beim Einfrieren/Auftauen, Verdaubarkeit ebenso wie die Fähigkeit zur Komplexbildung mit z.B. anorganischen oder organischen Ionen. Ein bevorzugtes Anwendungsgebiet von nativer Stärke ist das Gebiet der Backwaren und Nudeln.

2. Verwendung in nicht-Lebensmitteln

**[0063]** Das andere größere Gebiet der Verwendung von Stärke ist als ein Adjuvans in verschiedenen Produktionsprozessen oder als ein Additiv in technischen Produkten. Die wichtigsten Gebiete für die Verwendung von Stärke als ein Adjuvans sind zunächst die Papier- und Kartonindustrie. In diesem Gebiet wird die Stärke hauptsächlich für die Retention (dem Zurückhalten von Feststoffen), für Leimfüllstoffe und feine Partikel, als Verfestigungssubstanz und für die Dehydratisierung verwendet. Zusätzlich werden die vorteilhaften Eigenschaften der Stärke hinsichtlich Steifheit, Härte, Klang, Griffigkeit, Glanz, Glätte, Zugfestigkeit ebenso wie der Oberfläche verwendet.

2.1 Papier- und Kartonindustrie

**[0064]** Im Papierproduktionsprozeß kann eine Differenzierung zwischen vier Anwendungsfeldern gemacht werden, nämlich Oberfläche, Beschichtung, Masse und Versprühen.

**[0065]** Die Erfordernisse für Stärke hinsichtlich der Oberflächenbehandlung sind im Wesentlichen ein hohes Maß an Helligkeit, eine entsprechende Viskosität, eine hohe Viskositätsstabilität, eine gute Filmbildung ebenso wie eine niedrige Staubbildung. Wenn bei der Beschichtung verwendet, spielen der Feststoffgehalt, eine entsprechende Viskosität, eine hohe Fähigkeit zur Bindung ebenso wie eine hohe Farbstoffaffinität eine wichtige Rolle. Als Additiv zu der Masse sind eine rasche, einheitliche, verlustfreie Dispersion, eine hohe mechanische Stabilität und eine vollständige Retention in dem Papierbrei von Wichtigkeit. Wenn die Stärke beim Versprühen verwendet wird, sind auch der entsprechende Feststoffgehalt, die hohe Viskosität ebenso wie die hohe Bindungsfähigkeit wichtig.

2.2 Klebstoffindustrie

**[0066]** Ein wichtiges Anwendungsgebiet ist zum Beispiel in der Klebstoffindustrie, wo die Anwendungsgebiete in vier Gebiete unterteilt werden: die Verwendung als reiner Stärkeklebstoff, die Verwendung in Stärkeklebstoff, der mit Spezialchemikalien hergestellt wird, die Verwendung von Stärke als Additiv zu synthetischen Harzen und Polymerdispersionen ebenso wie die Verwendung von Stärke als Verlängerung für synthetische Klebstoffe. 90% aller Klebstoffe auf Stärkebasis werden bei der Produktion von Wellpappe, Papiersäcken und -tüten, Verbund Materialien für Papier und Aluminium, Kisten und Klebstoff zum Anfeuchten bei Umschlägen, Briefmarken usw. verwendet.

2.3 Textil- und Textilpflegeindustrie

**[0067]** Eine andere Möglichkeit der Verwendung als Adjuvans und Additiv ist bei der Produktion von Textilien und Textilpflegeprodukten. Innerhalb der Textilindustrie kann eine Differenzierung zwischen den folgenden vier Anwendungsgebieten gemacht werden; die Verwendung von Stärke als Appretur, d.h. als Adjuvans für die Glättung und Stärkung des Entkettungsverhaltens für den Schutz gegen Zugkräfte, die beim Weben aktiv sind, ebenso wie zur Erhöhung der Verschleißresistenz während des Webens, als ein Mittel zur Verbesserung des Textils hauptsächlich nach die Qualität verschlechternden Vorbehandlungen wie Bleichen, Färben usw., als Verdickungsmittel bei der Produktion von Farbpasten für das Verhindern der Farbstoffdiffusion und als ein Additiv für Schärmittel für Nähgarne.

2.4 Bauindustrie

**[0068]** Das vierte Anwendungsgebiet von Stärke ist ihre Verwendung als Additiv bei Baumaterialien. Ein Beispiel ist die Produktion von Gipskartonplatten, bei denen die Stärke, zu dem dünnen Pflaster gemischt, mit

Wasser pastenförmig wird, an die Oberfläche der Gipsplatte diffundiert und somit die Pappe an die Platte bindet. Andere Anwendungsgebiete ist die Beimischung zu Pflaster und Mineralfasern. In Fertigbeton kann Stärke für das Verlangsamen des Verklebungsprozesses verwendet werden.

### 2.5 Bodenstabilisierung

**[0069]** Darüber hinaus ist Stärke von Vorteil bei der Produktion von Mitteln für die Bodenstabilisierung, die für den temporären Schutz von Bodenpartikeln vor Wasser bei künstlichen Erdbewegungen verwendet werden. Gemäß des Wissens des Stands der Technik kann man von Kombinationsprodukten, die aus Stärke und Polymeremulsionen bestehen, annehmen, daß sie denselben die Erosion und Verkrustung reduzierenden Effekt haben wie die bisher verwendeten Produkte; sie sind jedoch beträchtlich billiger.

### 2.6 Verwendung von Stärke bei Pflanzenschutzmitteln und Düngemitteln

**[0070]** Ein anderes Anwendungsgebiet ist die Verwendung von Stärke bei Pflanzenschutzmitteln für die Modifikation der spezifischen Eigenschaften dieser Herstellungen. Zum Beispiel können Stärken für die Verbesserung des Anfeuchtens von Pflanzenschutzmitteln und Düngemitteln verwendet werden, für die dosierte Freisetzung des wirksamen Inhaltsstoffs, für die Umformung von flüssigen, flüchtigen und/oder riechenden aktiven Inhaltsstoffen in mikrokristalline, stabile, deformierbare Substanzen, für die Mischung von inkompatiblen Zusammensetzungen und für die Verlängerung der Dauer des Effekts wegen eines reduzierten Abbaus.

### 2.7 Arzneistoffe, Medizin und Kosmetikindustrie

**[0071]** Stärke kann auch auf den Gebieten der Arzneistoffe, Medizin und in der Kosmetikindustrie verwendet werden. In der pharmazeutischen Industrie kann die Stärke als Bindemittel für Tabletten oder für die Verdünnung des Bindemittels in Kapseln verwendet werden. Darüber hinaus ist Stärke als Zerfallsmittel für Tabletten geeignet, da sie nach dem Verschlucken Flüssigkeit absorbiert und nach einer kurzen Zeit so stark anschwillt, daß der aktive Inhaltsstoff freigesetzt wird. Aus Qualitätsgründen sind medizinische Fließpuder und Pudermittel weitere Anwendungsgebiete. Auf dem Gebiet der Kosmetika kann die Stärke zum Beispiel als Träger für Puderadditive verwendet werden, wie Duftmittel und Salicylsäure. Ein relativ umfangreiches Gebiet der Verwendung von Stärke ist Zahnpasta.

### 2.8 Stärke als ein Additiv bei Kohle und Briketts

**[0072]** Die Verwendung von als ein Additiv bei Kohle und Briketts ist ebenfalls denkbar. Durch Zugabe von Stärke kann Kohle in hoher Qualität quantitativ agglomeriert und/oder in Brikettform gebracht werden, womit die frühzeitige Zersetzung der Briketts verhindert wird. Grillkohle enthält zwischen 4 und 6% zugesetzte Stärke, erhitzte Kohle zwischen 0,1 und 0,5%. Darüber hinaus ist die Stärke geeignet als Bindemittel, da ihr Zusatz zu Kohle und Briketts die Emission von toxischen Substanzen beträchtlich reduziert.

### 2.9 Prozessierung von Erz- und Kohleschlamm

**[0073]** Darüber hinaus kann Stärke als Flockungsmittel bei der Prozessierung von Erz- und Kohleschlamm verwendet werden.

### 2.10 Stärke als Additiv bei der Gießerei

**[0074]** Ein anderes Anwendungsgebiet ist die Verwendung als Additiv bei der Prozessierung von Materialien beim Gießen. Für verschiedene Gießprozesse werden Kerne verwendet, die aus Sand produziert werden, der mit Bindemitteln gemischt ist. Heutzutage ist das am üblichsten verwendete Bindemittel Bentonit, gemischt mit modifizierten Stärken, zumeist schwellende Stärken.

**[0075]** Der Zweck der Zugabe von Stärke ist eine erhöhte Flußresistenz ebenso wie verbesserte Bindungsstärke. Darüber hinaus können schwellende Stärken mehr Vorraussetzungen für den Produktionsprozeß erfüllen, wie die Dispersionsfähigkeit in kaltem Wasser, die Rehydratisierbarkeit, die gute Mischfähigkeit in Sand und die hohe Bindefähigkeit für Wasser.

### 2.11 Die Verwendung von Stärke in der Gummiindustrie

**[0076]** In der Gummiindustrie kann Stärke für die Verbesserung der technischen und optischen Qualität ver-

wendet werden. Gründe dafür sind ein verbesserter Oberflächenglanz, verbesserte Griffigkeit und verbessertes Aussehen. Zu diesem Zweck wird die Stärke vor der kalten Vulkanisierung auf den klebrigen, gummierten Oberflächen der Gummisubstanzen dispergiert. Sie kann auch zur Verbesserung der Bedruckbarkeit von Gummi verwendet werden.

2.12 Produktion von Lederersatzstoffen

**[0077]** Ein anderes Anwendungsgebiet für modifizierte Stärke ist die Produktion von Lederersatzstoffen.

2.13 Stärke in synthetischen Polymeren

**[0078]** Im Plastikmarkt entstehen die folgenden Anwendungsgebiete: die Integration von Produkten, die von Stärke abgeleitet sind, in den Verarbeitungsprozeß (Stärke ist nur ein Füllmittel, es gibt keine direkte Bindung zwischen synthetischem Polymer und Stärke) oder alternativ die Integration von Produkten, die von Stärke abgeleitet sind, in die Produktion von Polymeren (Stärke und Polymer bilden eine stabile Bindung).

**[0079]** Die Verwendung von Stärke als reines Füllmittel kann nicht mit anderen Substanzen wie Talkum konkurrieren. Die Situation wird anders, wenn die spezifischen Eigenschaften der Stärke wirksam werden und das Eigenschaftsprofil des Endprodukts somit klar verändert wird. Ein Beispiel ist die Verwendung von Stärkeprodukten bei der Prozessierung von thermoplastischen Materialien wie Polyethylen. Dabei werden Stärke und das synthetische Polymer mittels Coexpression in einem Verhältnis von 1:1 kombiniert, um einen 'Master-Ansatz' zu bilden, von dem verschiedene Produkte mittels allgemeiner Techniken unter Verwendung von granuliertem Polyethylen produziert werden. Die Integration von Stärke in Polyethylenfilme kann eine verbesserte Substanzpermeabilität in Hohlkörpern, eine verbesserte Permeabilität für Wasserdampf, ein verbessertes antistatisches Verhalten, ein verbessertes anti-Block-Verhalten ebenso wie eine bessere Bedruckbarkeit mit wäßrigen Farben verursachen.

**[0080]** Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung von Stärke in Polyurethanschäumen. Wegen der Anpassung der Stärkederivate ebenso wie der Optimierung der Verarbeitungstechniken ist es möglich, die Reaktion zwischen synthetischen Polymeren und den Hydroxygruppen der Stärke zu kontrollieren. Das Resultat sind Polyurethanfilme, die wegen der Verwendung von Stärke die folgenden Eigenschaftsprofile haben: einen reduzierten thermischen Ausdehnungskoeffizient, ein vermindertes Schrumpfverhalten, ein verbessertes Druck-/Spannungsverhalten, eine verbesserte Permeabilität für Wasserdampf ohne eine Veränderung bei der Wasseraufnahme, eine reduzierte Entflammbarkeit und Reißdichte, kein Abfallen von brennbaren Teilen, keine Halogenide und reduzierte Alterung. Nachteile, die zur Zeit noch bestehen, sind eine reduzierte Druck- und Stoßstärke.

**[0081]** Die Produktentwicklung von Filmen ist nicht die einzige Option. Auch feste Plastikprodukte wie Töpfe, Teller und Schüsseln kann mittels eines Stärkegehalts von mehr als 50% produziert werden. Darüber hinaus bieten die Stärke/Polymermischungen den Vorteil, daß sie viel leichter biologisch abbaubar sind.

**[0082]** Darüber hinaus haben wegen ihrer extremen Fähigkeit zur Bindung von Wasser gepfropfte Stärkepolymere höchste Bedeutung gewonnen. Dies sind Produkte, die ein Rückgrat aus Stärke und ein Seitengitter eines synthetischen Monomers haben, das gemäß dem Prinzip des Radikalkettenmechanismus aufgepfropft wurde. Die heutzutage verfügbaren gepfropften Stärkepolymere sind durch eine verbesserte Bindungs- und Rückhaltefähigkeit von bis zu 1000 g Wasser pro g Stärke und eine hohe Viskosität gekennzeichnet. Diese Superabsorptionsmittel werden hauptsächlich auf dem Gebiet der Hygiene verwendet, z.B. in Produkten wie Windeln und Tücher, ebenso wie im landwirtschaftlichen Sektor, z.B. bei Samenpellets.

**[0083]** Entscheidend für die Verwendung der neuen, durch rekombinante DNA-Technik modifizierten Stärke sind einerseits die Struktur, der Wassergehalt, der Proteingehalt, der Lipidgehalt, der Fasergehalt, der Asche-/Phosphatgehalt, das Verhältnis Amylose/Amylopectin, die Verteilung der relativen molaren Masse, der Verzweigungsgrad, die Körnchengröße und form ebenso wie die Kristallisation und andererseits Eigenschaften, die zu folgenden Eigenschaften führen: das Fluß- und Sorptionsverhalten, die Pastenbildungstemperatur, die Viskosität, die Verdickungsleistung, die Löslichkeit, die Pastenstruktur, die Transparenz, die Hitze-, Scher- und Säureresistenz, die Tendenz zur Retrogradation, die Fähigkeit zur Gelbildung, die Resistenz beim Einfrieren/Auftauen, die Fähigkeit zur Komplexbildung, die Jodbindung, die Filmbildung, die Adhäsionskraft, die Enzymstabilität, die Verdaubarkeit und die Reaktivität.

**[0084]** Die Produktion von modifizierter Stärke durch genetische Manipulation einer transgenen Pflanze kann

die Eigenschaften der Stärke, die aus der Pflanze gewonnen wird, auf eine solche Weise modifizieren, daß weitere Modifikationen mit chemischen oder physikalischen Verfahren überflüssig werden. Andererseits können Stärken, die mittels rekombinanter DNA-Techniken modifiziert wurden, einer weiteren chemischen Modifikation unterworfen werden, die in einer weiteren Verbesserung der Qualität für gewisse der vorstehend beschriebenen Anwendungsgebiete resultieren wird. Diese chemischen Modifikationen sind im Prinzip dem Durchschnittsfachmann auf dem Fachgebiet bekannt. Dies sind insbesondere Modifikationen mittels

- Hitzebehandlung
- Säurebehandlung
- Oxidation
- Veresterung,

was zur Bildung von Phosphat-, Nitrat-, Sulfat-, Xanthat-, Acetat- und Citratstärken führt. Auch andere organische Säuren können für die Veresterung verwendet werden:

- Bildung von Stärkeethern

  Stärkealkylether, -O-allylether, -Hydroxyalkylether, -O-carboxylmethylether, N-enthaltende Stärkeether, P-enthaltende Stärkeether und S-enthaltende Stärkeether.
- Bildung von verzweigten Stärken
- Bildung von gepfropften Stärkepolymeren

**[0085]** Die beschriebenen Stärken werden bevorzugt bei der Produktion von Verpackungs- und Einwegmaterial verwendet.

**[0086]** Um die beschriebenen Nucleinsäuremoleküle in der Sense- oder Antisense-Orientierung in Pflanzenzellen zu exprimieren, werden diese mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft, die die Transkription in Pflanzenzellen sicherstellen. Solche regulatorischen DNA-Elementen sind insbesondere Promotoren. Grundsätzlich kann für die Expression jeder Promotor verwendet werden, der in Pflanzenzellen aktiv ist.

**[0087]** Der Promotor kann auf eine solche Weise ausgesucht werden, daß die Expression konstitutiv oder in einem gewissen Gewebe, zu einem gewissen Zeitpunkt der Entwicklung der Pflanze oder zu einem Zeitpunkt stattfindet, der durch äußere Umstände bestimmt wird. Hinsichtlich der Pflanze kann der Promotor homolog oder heterolog sein. Geeignete Promotoren für die konstitutive Expression sind z.B. der 35S RNA-Promotor des Blumenkohl-Mosaik-Virus und der Ubiquitin-Promotor aus Mais. Für eine knollenspezifische Expression in Kartoffeln kann der Patatingen-Promotor B33 (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23–29) verwendet werden. Ein Beispiel für einen Promotor, der nur in photosynthetisch aktiven Geweben die Expression sicherstellt, ist der ST-LS1-Promotor (Stockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7943–7947; (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445–2451). Für eine Endosperm-spezifische Expression sind der HMG-Promotor aus Weizen, der USP-Promotor, der Phaseolin-Promotor oder Promotoren von den Zein-Genen aus Mais geeignet. Darüber hinaus kann eine Terminationssequenz existieren, die zur korrekten Beendigung der Transkription und zur Hinzufügung eines Poly-A-Schwanzes zum Transkript dient, von dem man annimmt, daß er die Transkripte stabilisiert. Solche Elemente sind in der Literatur beschrieben (vgl. Gielen et al., EMBO J. 8 (1989), 23–29) und können nach Wunsch ausgetauscht werden.

**[0088]** Die vorliegenden Erfindung beschreibt Nucleinsäuremoleküle, die eine Stärkesynthase aus Weizen codiert. Dies erlaubt die Identifikation der Funktion dieses Isotyps bei der Stärkebiosynthese ebenso wie die Produktion von genetisch modifizierten Pflanzen, bei denen die Aktivität dieses Enzyms modifiziert ist. Dies ermöglicht die Synthese von Stärke mit einer modifizierten Struktur und daher mit modifizierten physikalisch-chemischen Eigenschaften in den Pflanzen, die auf diese Weise manipuliert wurden.

**[0089]** Die beschriebenen Nucleinsäuremoleküle können auch zur Produktion von Pflanzen verwendet werden, bei denen die Aktivität der beschriebenen Stärkesynthase erhöht oder reduziert ist und bei denen gleichzeitig die Aktivitäten von anderen Enzymen, die in die Stärkebiosynthese involviert sind, modifiziert sind. Dabei sind alle Arten von Kombinationen und Permutationen denkbar. Durch Modifikation der Aktivität von einem oder mehr Isotypen der Stärkesynthase in Pflanzen wird die Synthese einer Stärke bewirkt, die in ihrer Struktur verändert ist. Durch Erhöhung der Aktivität von einem oder mehreren Isotypen der Stärkesynthase in den Zellen des stärkespeichernden Gewebes von transformierten Pflanzen wie des Endosperms von Mais oder Weizen oder der Kartoffelknolle können erhöhte Ausbeuten das Resultat sein. Zum Beispiel können die beschriebenen Nucleinsäuremoleküle oder die entsprechenden Antisense-Konstrukte in Pflanzenzellen integriert werden, bei denen die Synthese von endogenen GBSS I-, SSS- oder GBSS II-Proteinen schon wegen eines An-

tisense-Effekts oder eine Mutation inhibiert ist, oder bei denen die Synthese des Branching Enzyme inhibiert ist (wie beschrieben von Nakamura et al. (vorstehend zitiert)).

**[0090]** Wenn die Inhibierung der Synthese von mehreren Stärkesynthasen in transformierten Pflanzen erreicht werden soll, können DNA-Moleküle für die Transformation verwendet werden, die gleichzeitig mehrere Regionen in der Antisense-Orientierung enthalten, die von einem geeigneten Promotor kontrolliert werden und die die entsprechenden Stärkesynthasen codieren. Dabei kann jede Sequenz von ihrem eigenen Promotor kontrolliert werden oder sonst können die Sequenzen als eine Fusion von einem gemeinsamen Promotor transkribiert werden. Im Allgemeinen wird die letzte Alternative bevorzugt werden, da in diesem Fall die Synthese der entsprechenden Proteine in etwa gleichem Maße inhibiert sein sollte.

**[0091]** Darüber hinaus ist es möglich, DNA-Moleküle zu konstruieren, die neben DNA-Sequenzen, die Stärkesynthasen codieren, weitere DNA-Sequenzen enthalten, die andere Proteine codieren, die in die Stärkesynthese oder -Modifikation involviert sind. Auch dabei können die Sequenzen wiederum in Serien verknüpft sein und von einem gemeinsamen Promotor transkribiert werden. Hinsichtlich der Länge der einzelnen codierenden Regionen, die in einem solchen Konstrukt verwendet werden, treffen die vorstehend erwähnten Fakten bezüglich der Produktion von Antisense-Konstrukten ebenfalls zu. Es gibt keine Obergrenze hinsichtlich der Zahl von Antisense-Fragmenten, die von einem Promotor in einem solchen DNA-Molekül transkribiert werden. Das resultierende Transkript sollte jedoch nicht länger als 10 kb, vorzugsweise 5 kb, sein.

**[0092]** Codierende Regionen, die in solchen DNA-Molekülen in Kombination mit anderen codierenden Regionen in der Antisense-Orientierung hinter einem geeigneten Promotor liegen, können von DNA-Sequenzen abgeleitet sein, die die folgenden Proteine codieren: Granula-gebundene Stärkesynthasen (GBSS I und II), andere lösliche Stärkesynthasen, Branching Enzymes, Debranching Enzymes, Disproportionierungsenzyme und Stärkephosphorylasen. Diese Aufzählung dient nur als ein Beispiel. Die Verwendung von anderen DNA-Sequenzen im Rahmen einer solchen Kombination ist auch denkbar.

**[0093]** Mittels solcher Konstrukte ist es möglich, die Synthese von mehreren Enzymen gleichzeitig innerhalb der Pflanzenzellen zu inhibieren, die mit diesen Molekülen transformiert wurden.

**[0094]** Darüber hinaus können die Konstrukte in klassische Mutanten integriert werden, denen ein oder mehrere Gene der Stärkebiosynthese fehlen. Diese Defekte können mit den folgenden Proteinen im Zusammenhang stehen: Granula-gebundene (GBSS I und II) und lösliche Stärkesynthasen (SSS I und II), Branching Enzymes (BE I und II), Debranching Enzymes (R-Enzyme), Disproportionierungsenzyme und Stärkephosphorylasen. Diese Aufzählung dient nur als ein Beispiel.

**[0095]** Mittels einer solchen Strategie ist es weiterhin möglich, die Synthese von mehreren Enzymen gleichzeitig innerhalb der Pflanzenzellen zu inhibieren, die mit diesen Nucleinsäuremolekülen transformiert wurden.

**[0096]** Um die Integration von fremden Genen in höhere Pflanzen zu bewerkstelligen, stehen eine große Anzahl an Clonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für E. coli und ein Markergen für die Selektion von transformierten Bakterienzellen enthalten. Beispiele für solche Vektoren sind pBR322, die pUC-Serie, die M13mp-Serie, pACYC184 usw.. Die gewünschte Sequenz kann an einer geeigneten Restriktionsstelle in den Vektor integriert werden. Das erhaltene Plasmid wird für die Transformation von E. coli-Zellen verwendet. Die transformierten E. coli-Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet und anschließend geerntet und lysiert. Das Plasmid wird gewonnen. Als ein Analyseverfahren für die Charakterisierung der erhaltenen Plasmid-DNA werden im Allgemeinen die Restriktionsanalyse, die Gelelektrophorese und andere biochemische-molekularbiologische Verfahren verwendet. Nach jeder Manipulation kann die Plasmid-DNA gespalten werden und die erhaltenen DNA-Fragmente können mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden. Jede Plasmid-DNA kann in dasselbe oder in andere Plasmide cloniert werden.

**[0097]** Um DNA in Pflanzenwirtszellen zu integrieren, steht ein großer Bereich an Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation von Pflanzenzellen mit T-DNA unter Verwendung von Agrobakterium tumefaciens oder Agrobakterium rhizogenes als Transformationsmedium, die Fusionierung von Protoplasten, die Injektion und die Elektroporation von DNA, die Integration von DNA mittels des biolistischen Verfahrens ebenso wie weitere Möglichkeiten.

**[0098]** Im Falle der Injektion, des biolistischen Verfahrens und der Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen bestehen keine besonderen Erfordernisse hinsichtlich der verwendeten Plasmide. Einfache Plasmide wie pUC-Derivate können verwendet werden. Im Falle, daß ganze Pflanzen aus den auf solche Weise transfor-

mierten Zellen regeneriert werden sollen, sollte jedoch ein selektierbares Markergen anwesend sein.

**[0099]** In Abhängigkeit von dem Verfahren zur Integration der gewünschten Gene in die Pflanzenzelle können weitere DNA-Sequenzen notwendig sein. Wenn z.B. das Ti- oder Ri-Plamid für die Transformation der Pflanzenzelle verwendet wird, sollte üblicherweise mindestens die rechte Grenze, häufiger jedoch die rechte und die linke Grenze der Ti- und Ri-Plasmid-T-DNA mit dem fremdem Gen verbunden sein, um als flankierende Region integriert zu werden.

**[0100]** Wenn für die Transformation Agrobakterien verwendet werden, sollte die zu integrierende DNA in spezielle Plasmide cloniert werden, nämlich in einen intermediären Vektor oder einen binären Vektor. Wegen Sequenzen, die mit den Sequenzen innerhalb der T-DNA homolog sind, kann der intermediäre Vektor aufgrund der homologen Rekombination in das Ti-Plasmid oder das Ri-Plamid von Agrobakterium integriert werden. Dieses enthält auch die vir-Region, die für den Transfer der T-DNA erforderlich ist. Intermediäre Vektoren können in Agrobakterien nicht replizieren. Mittels eines Helfer-Plasmids kann der intermediäre Vektor in Agrobakterium tumefaciens transferiert werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in E. coli als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein selektierbares Markergen ebenso wie einen Linker oder Polylinker, der von der rechten und der linken T-DNA-Grenzregion eingerahmt wird. Sie können direkt in Agrobakterien transformiert werden (Holsters et al., Mol, Gen. Genet. 163 (1978), 181–187). Das Agrobakterium, das als Wirtszelle dient, sollte ein Plasmid enthalten, das eine vir-Region trägt. Diese vir-Region ist üblicherweise für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle erforderlich. Zusätzliche T-DNA kann anwesend sein. Das auf diese Weise transformierte Agrobakterium wird für die Transformation von Pflanzenzellen verwendet.

**[0101]** Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen wurde intensiv erforscht und ausreichend beschrieben in der EP 120 516; Hoekema, in: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasserdam (1985), Kapitel V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant. Sci., 4, 1–46 und An et al., EMBO J. 4 (1985), 277–287.

**[0102]** Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzellen können Pflanzenexplantate in geeigneter Weise mit Agrobakterium tumefaciens oder Agrobakterium rhizogenes gemeinsam gezüchtet werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. Stücke von Blättern, Stammsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder in Suspension gezüchtet Pflanzenzellen) können dann ganze Pflanzen in einem geeigneten Medium regeneriert werden, das für die Selektion von transformierten Zellen Antibiotika oder Biozide enthalten kann. Die auf diese Weise erhaltenen Pflanzen können dann darauf untersucht werden, ob die integrierte DNA vorhanden ist oder nicht. Andere Möglichkeiten für die Integration von fremder DNA unter Verwendung des biolistischen Verfahrens oder durch Transformation von Protoplasten sind dem Durchschnittsfachmann auf dem Fachgebiet bekannt ( vgl. z.B. Willmitzer, L., 1993 Transgenic Plants. In: Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, Herausgeber), Band 2, 627–659, VCH Weinheim-New York-Basel-Cambridge).

**[0103]** Alternative Systeme für die Transformation von einkeimblättrigen Pflanzen sind die Transformation mittels des biolistischen Wegs, die elektrisch oder chemisch induzierte DNA-Integration in Protoplasten, die Elektroporation von partiell durchlässig gemachten Zellen, die Makroinjektion von DNA in Blütenstände, die Mikroinjektion von DNA in Mikrosporen und pro-Embryonen, die DNA-Integration durch sprossende Pollen und die DNA-Integration in Embryonen durch Schwellen (ein Überblick wird gegeben in: Potrykus, Physiol. Plant (1990) 269–273).

**[0104]** Während die Transformation von zweikeimblättrigen Pflanzen mit Ti-Plasmid-Vektorsystemen mittels Agrobakterium tumefaciens eine gut etabliertes Verfahren ist, zeigen neuere Untersuchungen, daß die Transformation mit Vektoren auf der Basis von Agrobakterium auch im Falle von einkeimblättrigen Pflanzen verwendet werden kann (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993) 491–506; Hiei et al., Plant J. 6 (1994), 271–282; Bytebier et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 5345–5349; Raineri et al., Bio/Technology 8 (1990), 33–38; Gould et al., Plant Physiol. 95 (1991), 426–434; Mooney et al., Plant, Cell Tiss. & Org. Cult. 25 (1991) 209–218; Li et al., Plant Mol. Biol. 20 (1992), 1037–1048).

**[0105]** Drei der vorstehend erwähnten Transformationssysteme wurden in der Vergangenheit für verschiedene Arten von Getreide etabliert: die Elektroporation von Pflanzengewebe, die Transformation von Protoplasten und der DNA-Transfer mittels Partikelbombardierung in regeneratives) Gewebe und Zellen (ein Überblick wird gegeben in: Jähne et al., Euphytica 85 (1995), 35–44).

**[0106]** In der entsprechenden Literatur wird die Transformation von Weizen auf verschiedenen Wegen be-

schrieben (Übersichtsartikel in Maheshwari et al., Critical Reviews in Plant Science 14 (2) (1995), 149–178). Hess et al., (Plant Sci. 72 (1990), 233) verwendeten die Makroinjektion, um Pollen und Agrobakterien nah zueinander zu bringen. Die Mobilisierung des Plasmids, das das nptII-Gen als selektierbaren Marker enthält, wurde mittels Southern-Blot-Analyse und NPTII-Test bewiesen. Die Transformanten bildeten einen normalen Phänotyp und waren fruchtbar. Die Kanamycin-Resistenz konnte bei zwei aufeinander folgenden Generationen bewiesen werden.

**[0107]** Die erste transgene, fruchtbare Weizenpflanze, die nach Bombardierung mit an Mikroprojektilen gebundener DNA regeneriert werden konnte, wurde von Vasil et al. (Bio/Technology 10 (1992), 667–674) beschrieben. Das Zielgewebe für die Bombardierung war eine embryogene Kalluskultur (Typ C-Kallus). Das bar-Gen, das eine Phosphinotricin-Phosphotransferase codiert und daher Resistenz gegen das Herbizid Phosphinotricin verleiht, wurde als selektierbares Markergen verwendet.

**[0108]** Ein weiteres System wurde von Weeks et al. (Plant Physiol. 102 (1993), 1077–1084) ebenso wie von Becker et al. (Plant J. 5(2) (1994), 299–307) beschrieben. Hier wurde das Scutellum von unreifen Embryonen als Zielgewebe für die DNA-Transformation verwendet. In einer einführenden in vitro-Phase wurde das Scutellum zur Induktion von somatischen Embryonen veranlaßt. Die Effizienz der Transformation ist in dem von Becker et al. (vorstehend zitiert) entwickelten System mit 1 transgenen Pflanze pro 83 Embryonen der Art 'Florida' beträchtlich höher als in dem von Weeks et al. entwickelten System mit 1 bis 2 transgenen Pflanzen pro 1000 Embryonen der Art 'Bobwhite'.

**[0109]** Das von Becker et al. (vorstehend zitiert) entwickelte System bildet eine Basis für die in den Beispielen beschriebenen Transformationsexperimente.

**[0110]** Nachdem die eingebrachte DNA in das Genom der Pflanzenzelle integriert wurde, bleibt sie dort üblicherweise stabil und verbleibt auch bei den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle. Sie enthält üblicherweise einen selektierbaren Marker, der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegen ein Biozid wie Phosphinotricin oder gegen ein Antibiotikum wie Kanamycin, G 418, Bleomycin oder Hygromycin usw. verleiht. Der individuell selektierte Marker sollte daher eine Selektion von transformierten Zellen gegenüber Zellen erlauben, denen die integrierte DNA fehlt.

**[0111]** Die transformierten Zellen wachsen auf dem üblichen Weg innerhalb der Pflanzen (vgl. auch McCormick et al., Plant Cell Reports 5 (1986), 81–84). Die resultierenden Pflanzen können auf dem üblichen Weg gezüchtet werden und mit Pflanzen gekreuzt werden, die dasselbe transformierte genetische Erbe oder ein anderes genetisches Erbe haben. Die resultierenden hybriden Individuen haben die entsprechenden phänotypischen Eigenschaften. Die Pflanzenzellen produzieren Samen.

**[0112]** Zwei oder mehrere Generationen sollten gezüchtet werden, um sicherzustellen, ob die phänotypische Eigenschaft stabil behalten wird und ob sie übertragen wird. Darüber hinaus sollten Samen geerntet werden, um sicherzustellen, daß der entsprechende Phänotyp oder andere Eigenschaften erhalten bleiben.

**[0113]** In den Beispielen werden die folgenden Verfahren verwendet:

1. Clonierung

**[0114]** Für die Clonierung in E. coli wurde der Vektor pBluescript II SK (Stratagene) verwendet.

2. Bakterienstämme

**[0115]** Für den Bluescript-Vektor und für die Antisense-Kontrukte wurde der E. coli-Stamm DH5α (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburgh, USA) verwendet, Für das Ausschneiden in vivo wurde der E. coli-Stamm XL1-Blue verwendet.

3. Transformation von unreifen Weizenembryonen

Verwendete Medien

MS: 100 ml/l Makrosalze
1 ml/l Mikrosalze
2 ml/l Fe/NaEDTA

30 g/l Saccharose

(D. Becker und H. Lörz, Plant Tissue Culture Manual (1996), B12: 1–20)

#30: MS + 2.4-D (2 mg/l)
#31 MS + 2.4-D (2 mg/l) + Phosphinotricin (PPT, aktive Komponente des Herbizids BASTA® (2 mg/l)
#32 MS + 2.4-D (0,1 mg/l) + PPT (2 mg/l)
#39 MS + 2.4-D (2 mg/l) + jeweils 0,5 M Mannitose/Sorbit

**[0116]** Die angegebenen Medien wurden mit KOH auf einen pH-Wert von 5,6 eingestellt und mit 0,3 % Gelrite verstärkt.

**[0117]** Das Verfahren der Transformation von unreifen Embryonen von Weizen wurde von Becker und Lörz entwickelt und optimiert (D. Becker und H. Lörz, Plant Tissue Culture Manual (1996), B12: 1–20).

**[0118]** In den Experimenten, die im Folgenden beschrieben werden, wurde das von Becker und Lörz (vorstehend zitiert) festgelegte Protokoll befolgt.

**[0119]** Für die Transformation werden Ohren mit Caryopsen im Entwicklungsstadium 12 bis 14 Tage nach Anthese geerntet und der Oberflächesterilisation unterworfen. Die isolierten Scutella werden mit auf das Medium gerichteter Embryoachse auf dem Induktionsmedium #30 ausplattiert.

**[0120]** Nach 2–4 Tagen Vorkultur (26°C, dunkel) werden die Explantate auf das Medium #39 für die osmotische Vorkultur (2–4 Std., 26°C, dunkel) übertragen. Für die biolistische Transformation werden Goldpartikel von 29 µg, auf denen 5 µg oder 73 ng von Ziel-DNA niedergeschlagen wurden, für jeden Schuß verwendet. Da die durchgeführten Experimenten co-Transformationen sind, wird die Ziel-DNA zu dem Niederschlagsgemisch in einem Verhältnis von 1:1 zugegeben, das aus dem Zielgen und einem Resistenzmarkergen (bar-Gen) besteht.

4. DIG-Markierung der DNA-Fragmente

**[0121]** Die Markierung von DNA-Fragmenten, die als Durchmusterungssonden verwendet werden, wurde durch eine spezifische PCR unter Einschluß von DIG-markiertem dUTP (Boehringer Mannheim, Deutschland) erreicht.

Beispiel 1

Identifikation, Isolierung und Charakterisierung einer cDNA, die lösliche Stärkesynthase aus Weizen (Tricitum aestivum L., cv. Florida) codiert

**[0122]** Die Synthese von cDNA resultierte von Poly(A)$^+$-RNA von etwa 21 Tage alten Weizen-Caryopsen. Alle im folgenden erwähnten Experimente wurden gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt (ZAP-cDNA Synthesis Kit und ZAP-cDNA Gigapack II Gold Cloning Kit, Stratagene GmbH, Heidelberg).

**[0123]** Nach der Bestimmung der Titer der cDNA-Bibliothek konnte ein primärer Titer von $1{,}25 \times 10^6$ PbE/ml gefunden werden. Die Durchmusterung wurde mittels eines DIG-markierten DNA-Fragments durchgeführt. Dabei wurde ein DIG-markiertes PCR-Fragment, das ein Subfragment von der löslichen Stärkesynthase aus Reis (Baba et al., vorstehend zitiert) codiert, als Sonde verwendet. Die für die PCR verwendeten Primer hatten die Sequenzen
R1: ACA GGA TCC TGT GCT ATG CGG CGT GTG AAG (Seq ID No. 3)
R2: TTG GGA TCC GCA ATG CCC ACA GCA TTT TTT TC (Seq ID No. 4)

**[0124]** Für die Durchmusterung wurden etwa $5 \times 10^4$ PbE pro Platte (15 cm Durchmesser) ausplattiert. Positive Clone wurden aussortiert. Mittels in vivo-Ausschneiden wurden aussortierte Clone als pBluescript SK (–)-Phagemide erhalten.

**[0125]** Nach der Analyse der Clone mittels Minipräparationen und nach der Restriktion der Plasmid-DNA wurde der TaSSS-Clon weiter verarbeitet.

Beispiel 2

Sequenzanalyse der cDNA-Insertion des Plasmids pTaSSS

**[0126]** Die Plasmid-DNA des Clons TaSSS wurde isoliert und die Sequenz der cDNA-Insertion wurde mittels des Didesoxynucleotid-Verfahrens bestimmt (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463–5467).

**[0127]** Zuerst wurde eine partielle Sequenz bestimmt, die die Nucleotide 186–2239 umfaßt, wie dargestellt in Seq ID No. 1, die einen zusätzliche G-Rest an ihrem 5'-Ende enthielt. Die Insertion des Clons TaSSS hat eine Länge von 2239 bp und stellt eine cDNA nahezu vollständiger Länge dar. Die Nucleotidsequenz ist unter Seq ID No. 1 dargestellt. Die entsprechende Aminosäuresequenz ist unter Seq ID No. 2 dargestellt. Eine mutmaßliche Signalpeptidspaltstelle liegt zwischen den Aminosäureresten 33 und 34, angezeigt in Seq ID No. 1.

**[0128]** Eine Sequenzanalyse und ein Vergleich mit bereits publizierten Sequenzen zeigten, daß die unter Seq ID No. 1 gezeigte Sequenz neu ist und eine codierende Region nahezu voller Länge umfaßt, die Homologien mit löslichen Stärkesynthasen von anderen Organismen zeigt. Mittels der partiellen cDNA-Sequenz von TaSSS ist es dem Durchschnittsfachmann auf dem Fachgebiet der Molekularbiologie möglich, die fehlende Region an der 5'-Region zu isolieren und damit einen vollständigen cDNA-Clon zu erhalten. Um dies zu tun, kann die 5'-Region des Clons TaSSS als Sonde für die Durchmusterung der gesamten cDNA verwendet werden und ein vollständiger Clon kann unter Verwendung von Standardverfahren mittels Hybridisierung isoliert werden. Andererseits kann das fehlende 5'-Ende unter Verwendung eines 5'-Race-Verfahrens (z.B. Boehringer Mannheim oder andere Hersteller) erhalten werden.

Beispiel 3

Produktion des Pflanzentransformationsvektors pTaSSS-as

**[0129]** Um eine Antisense-RNA für die isolierte cDNA aus Weizen zu exprimieren, wurde ein Pflanzentransformationsvektor auf der Basis von pUC19 als Grundplasmid entworfen, bei dem die cDNA-Insertion des Plamids pTaSSS mit einem DNA-Fragment in der Antisense-Orientierung verknüpft ist, wobei die Expression vom Ubiquitin-Promotor reguliert wird. Der Promotor besteht aus dem ersten nicht translatierten Exon und dem ersten Intron des Ubiquitin1-Gens von Mais (Christensen A.H. et al., Plant Molecular Biology 18 (1992), 675–689).

**[0130]** Teile des Polylinkers und der NOS-Terminator werden von dem Plasmid pAct1.cas erhalten (CAMBIA, TG 0063; Cambia, GPO Box 3200, Canberra ACT 2601, Australien). Vektorkonstrukte mit diesem Terminator und Konstrukte, die auf pAct1.cas beruhen, sind beschrieben in McElroy et al. (Molecular Breeding 1 (1995), 27–37). Für die Transformation von Weizen wurde pTaSSS, wie vorstehend beschrieben, verwendet.

Illustrationsbeispiel 4

Identifikation, Isolation und Charakterisierung einer anderen cDNA, die Stärkesynthase aus Weizen (Tricitum aestivum L., cv Florida) codiert

**[0131]** Bei einem Sequenzvergleich der bisher bekannten Sequenzen, die lösliche und an Granula gebundene Stärkesynthasen von Pflanzen codieren, war es offensichtlich, daß es innerhalb der verschiedenen Proteine drei hoch konservierte Regionen gibt.

**[0132]** Um lösliche Stärkesynthasen von Weizen zu isolieren, wurden diese drei Regionen selektiert, um polyclonale Peptidantikörper zu erzeugen. Dafür wurden drei synthetische Polypeptide mit den folgenden Aminosäuresequenzen produziert:
Peptid 1: NH2-PWSKTGGLGDVC-COOH (SEQ ID NO: 7)
Peptid 2: NH2-PSRFEPCGLNQLY-COOH (SEQ ID NO: 8)
Peptid 3: NH2-GTGGLRDTVENC-COOH (SEQ ID NO: 9)

**[0133]** Diese Peptide werden mit dem KLH-Träger („keyhole limpet homocyanin") gekoppelt und anschließend für die Produktion von polyclonalen Antikörpern in Kaninchen verwendet (Eurogentec, Seraing, Belgien).

**[0134]** Die resultierenden Antikörper wurden wie folgt bezeichnet:
anti-SS1 polyclonaler Antikörpern gegen Peptid 1
anti-SS2 polyclonaler Antikörpern gegen Peptid 2

anti-SS3 polyclonaler Antikörpern gegen Peptid 3

**[0135]** Diese Antikörper wurden anschließend verwendet, um eine cDNA-Bibliothek aus Weizen-Caryopsen nach Sequenzen zu durchmustern, die Stärkesynthasen von Weizen codieren. Zu diesem Zweck wurde eine cDNA-Expressionsbibliothek verwendet, die, wie in Beispiel 1 beschrieben, produziert worden war. Für die Analyse der Phagenplaques wurden diese auf Nitrocellulose-Filter übertragen, die zuvor 30–60 Minuten in einer 10 mM IPTG-Lösung inkubiert und anschließend auf Whatman-Papier getrocknet worden waren. Die Übertragung dauerte bei 37°C 3 Std. Danach wurden die Filter bei Raumtemperatur 30 Min. in einer Blockierungslösung inkubiert und zweimal 5–10 Min. in TBST-Puffer gewaschen. Die Filter wurden bei Raumtemperatur 1 Std. oder bei 4°C 16 Std. mit den polyclonalen Antikörpern in einer geeigneten Verdünnung geschüttelt. Die Identifikation von Plaques, die ein Protein exprimieren, das von einem der Antikörper erkannt wurde, wurde mittels des Immun-Blot Assay Kit; Goat Anti-Rabbit IgG (Biorad) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

**[0136]** Phagenclone der cDNA-Bibliothek, die ein Protein exprimienen, das von einem der Antikörper erkannt worden war, wurden unter Verwendung von Standardverfahren weiter gereinigt. Mittels des in vivo-Ausschneideverfahrens (Strategene) wurden von positiven Phagenclonen E. coli-Clone produziert, die ein doppelsträngiges pBluescnipt II SK-Plasmid mit der entsprechenden cDNA-Insertion zwischen der EcoRI- und der XhoI-Stelle des Polylinkers enthielten. Nach der Überprüfung der Größe und des Restriktionsmusters der Insertion wurde ein geeigneter Clon, TaSS1, einer Sequenzanalyse unterzogen.

Illustrationsbeispiel 5

Sequenzanalyse der cDNA-Insertionen des pTaSS1-Plamids

**[0137]** Die Plasmid-DNA wurde von dem pTaSS1-Clon isoliert und die Sequenz der cDNA-Insertion wurde mittels Standardverfahren unter Verwendung des Didesoxynucleotid-Verfahrens bestimmt (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463–5467).

**[0138]** Zuerst wurde eine partielle Sequenz bestimmt, die die Nucleotide 1084 bis 2825 umfaßt, wie dargestellt in Seq ID No. 5.

**[0139]** Die Insertion des Clons TaSS1 hat eine Länge von 2825 bp und stellt eine vollständige cDNA dar. Die Nucleotidsequenz ist unter Seq ID No. 5 dargestellt. Die entsprechende Aminosäuresequenz ist unter Seq ID No. 6 dargestellt.

**[0140]** Eine Sequenzanalyse und ein Vergleich mit bereits publizierten Sequenzen zeigte, daß die unter Seq ID No. 5 gezeigte Sequenz neu ist und eine codierende Region umfaßt, die Homologien mit Stärkesynthasen von anderen Organismen zeigt. Es wird angenommen, daß diese cDNA ein Protein codiert, das die biologische Aktivität einer an Granula gebundenen Stärkesynthase hat.

**[0141]** Darüber hinaus wurde gefunden, daß wegen Homologien mit bekannten Consensussequenzen für Signalpeptidspaltstellen das vermutliche Signaltransitpeptid zwischen den Positionen 57 und 58 oder zwischen den Positionen 60 und 61 in der Aminosäuresequenz abgespalten wird, wie sie in Seq ID No. 6 gezeigt wird.

Beispiel 6

Produktion des Pflanzentransformationsvektors pTaSS1-as

**[0142]** Um eine partielle Antisense-RNA für die isolierte cDNA aus Weizen zu exprimieren, wurde ein Pflanzentransformationsvektor auf der Basis von pUC19 als Grundplasmid entworfen. Der Pflanzentransformationsvektor enthält partiell die cDNA-Insertion des Plamids pTaSSS1 in der Antisense-Orientierung. Die Expression wird vom Ubiquitin-Promotor reguliert. Der Promotor besteht aus dem ersten nicht translatierten Exon und dem ersten Intron des Ubiquitin1-Gens von Mais (Christensen A.H. et al., Plant Molecular Biology 18 (1992), 675–689).

**[0143]** Teile des Polylinkers und der NOS-Terminator sind von dem Plasmid pAct1.cas abgeleitet (CAMBIA, TG 0063; Cambia, GPO Box 3200, Canberra ACT 2601, Australien). Vektorkonstrukte mit diesem Terminator und Konstrukte, die auf pAct1.cas beruhen, sind beschrieben in McElroy et al. (Molecular Breeding 1 (1995), 27–37).

**[0144]** Für die Transformation von Weizen wird der pTaSS1-as-Vektor, wie vorstehend beschrieben, verwendet.

Beispiel 7

Komplementierung einer E. coli-Mutante mit einem cDNA-Clon, der eine lösliche Stärkesynthase aus Weizen codiert

**[0145]** Die Enzymaktivität der löslichen Stärkesynthase, die von dem cDNA-Clon TaSSS (Beispiel 2) codiert wird, wurde durch Komplementationsexperimente unter Verwendung der E. coli-Mutante Hfr G6MD2 (M. Schwartz-Stamm; CGSC # 5080; E. coli Genetic Stock Center, New Haven, USA) als Wirt für die Genexpression analysiert. Die E. coli-Mutante zeigt eine Deletion des glg-Operons, das die bakterielle ADP-Glucosepyrophosphorylase (glg C), Glycogensynthase (glg A) und das Branching Enzyme (glg B) codiert. Diese Mutation resultiert in dem Unvermögen zur Glycogensynthese über den ADP-Glucose-Reaktionsweg. Zusätzlich verhindert eine Deletion des mal A-Operons die Synthese von linearen α-1,4-Glucanen durch das Enzym Amylomaltase (mal Q).

**[0146]** Die Funktionsfähigkeit der löslichen Stärkesynthase wurde durch Cotransformation der Plasmide pTaSSSΔ188 und pACAG in die Mutante G6MD2 getestet. Das Plasmid pTaSSSΔ188 umfaßt die Nucleotide 188–2239 der cDNA-Sequenz von 2239 bp, die die lösliche Stärkesynthase codiert. Die cDNA wird als EcoRI/XhoI-Fragment in die Polylinkerregion des pBluescript-Vektors (Stratagene) inseriert. Dies erlaubt die Fusion des N-Terminus des α-Peptids der beta-Galactosidase, die durch den Vektor codiert wird, im Rahmen mit einem Teil der löslichen Stärkesynthase.

**[0147]** Eine erfolgreiche Komplementierung der Glycogensynthase (glg A)-Mutation in G6MD2 ist abhängig von der Expression einer ADP-Glucose-Pyrophosphorylaseaktivität, die verantwortlich ist für die Bereitstellung von ADP-Glucose, dem Substrat für die Synthese von α-1,4-Glucanen. Daher wurde das Plasmid pACAG (Abel G.J.W., (1995), Untersuchungen zur Funktion von Stärke-Synthasen in der Kartoffel (Solanum tuberosum L.), Dissertation, Freie Universität Berlin), das die codierende Region des glg C-Lokus umfaßt, der von dem E. coli-Stamm LCB 618 (Baecker et al., J. Biol. Chem, 258 (1983) 5084–5088) isoliert wurde, unter der Kontrolle des lacZ-Promotors cotransformiert. Die codierte ADP-Glucose-Pyrophosphorylaseaktivität wird weniger durch den Aktivator Fructose-1,6-biphosphat und den Inhibitor AMP beeinflußt, was in einer ausreichenden Bereitstellung von ADP-Glucose resultiert.

**[0148]** Zellen, die mit den Konstrukten pTaSSSΔ188 und pACAG cotransformiert waren, wurden auf LB-Agarplatten ausplattiert, die mit 1 % Glucose, 1 mM IPTG und 50 µM Diaminopimelat ergänzt waren. Die resultierenden Kolonien wurden mit Joddampf gefärbt. Die transformierten G6MD2-Zellen zeigten eine hellblau-bräunliche Farbe im Gegensatz zu der gelblichen Farbe der nicht transformierten Kolonien, was die ADP-Glucose: α-1,4-D-Glucan-4-α-glucosyltransferaseaktivität des exprimierten Fusionsproteins zeigt.

**[0149]** Das System wurde durch Jodfärbung von G6MD2-Zellen überprüft, die mit den Konstrukten pACAG und pEc5.3 cotransformiert waren. Das Plamid pEc5.3 umfaßt ein Glycogensynthase (glg A)-Gen, das mittels der PCR-Technik aus dem E. coli-Stamm DH5α isolierte wurde (Abel G.J.W., (1995), Untersuchungen zur Funktion von Stärke-Synthasen in der Kartoffel (Solanum tuberosum L.), Dissertation, Freie Universität Berlin). Die transformierten Zellen zeigten nach der Färbung mit Jod eine dunkelblaue Farbe, was die Synthese von α-1,4-Glucanen zeigt.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION

(i) ANMELDER
(A) NAME: Bayer CropScience GmbH
(B) STRASSE: Brüningstrasse 4
(C) STADT: Frankfurt
(E) LAND: DE
(F) POSTLEITZAHL (PLZ): 65929

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: Nucleinsäuremoleküle, die für Enzyme aus Weizen kodieren, welche an der Stärkesynthese beteiligt sind.

(iii) ZAHL AN SEQUENZEN: 9

(iv) COMPUTERLESBARE FORM:
(A) ART DES MEDIUMS: Floppy Disk
(B) COMPUTER: IBM PC kompatibel
(C) BETRIEBSSYTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 2239 Basenpaare
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA zu RNA

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(iv) ANTISENSE: Nein

(vi) ORIGINALQUELLE:
(A) ORGANISMUS: Triticum aestivum L.
(B) STAMM: cv. Florida
(E) HAPLOTYP: ca. 21 d-Caryopsen

(vii) UNMITTELBARE QUELLE:
(A) BIBLIOTHEK: cDNA-Bibliothek in pBluescript sk ( - )
(B) CLON: TaSSS

(ix) EIGENSCHAFT:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE: 3 . . 2017

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NO: 1:

```
CG ACG CAG CCG CCC CTG CCG GAC GCC GGC GTG GGG GAA CTC GCG CCC      47
   Thr Gln Pro Pro Leu Pro Asp Ala Gly Val Gly Glu Leu Ala Pro
     1               5                  10                  15
```

```
GAC CTC CTG CTC GAA GGG ATT GCT GAG GAT TCC ATC GAC AGC ATA ATT        95
Asp Leu Leu Leu Glu Gly Ile Ala Glu Asp Ser Ile Asp Ser Ile Ile
                20                  25                  30

GTG GCT GCA AGT GAG CAG GAT TCT GAG ATC ATG GAT GCG AAT GAG CAA       143
Val Ala Ala Ser Glu Gln Asp Ser Glu Ile Met Asp Ala Asn Glu Gln
            35                  40                  45

CCT CAA GCT AAA GTT ACA CGT AGC ATC GTG TTT GTG ACT GGT GAA GCT       191
Pro Gln Ala Lys Val Thr Arg Ser Ile Val Phe Val Thr Gly Glu Ala
        50                  55                  60

GCT CCT TAT GCA AAG TCA GGG GGG TTG GGA GAT GTT TGT GGT TCG TTA       239
Ala Pro Tyr Ala Lys Ser Gly Gly Leu Gly Asp Val Cys Gly Ser Leu
    65                  70                  75

CCA ATT GCT CTT GCT GCT CGT GGT CAC CGA GTG ATG GTT GTA ATG CCA       287
Pro Ile Ala Leu Ala Ala Arg Gly His Arg Val Met Val Val Met Pro
80                  85                  90                  95

AGA TAC TTA AAT GGG TCC TCT GAT AAA AAC TAT GCA AAG GCA TTA TAC       335
Arg Tyr Leu Asn Gly Ser Ser Asp Lys Asn Tyr Ala Lys Ala Leu Tyr
            100                 105                 110

ACT GCG AAG CAC ATT AAG ATT CCA TGC TTT GGG GGA TCA CAT GAA GTG       383
Thr Ala Lys His Ile Lys Ile Pro Cys Phe Gly Gly Ser His Glu Val
        115                 120                 125

ACC TTT TTT CAT GAG TAT AGA GAC AAC GTC GAT TGG GTG TTT GTC GAT       431
Thr Phe Phe His Glu Tyr Arg Asp Asn Val Asp Trp Val Phe Val Asp
    130                 135                 140

CAT CCG TCA TAT CAC AGA CCA GGA AGT TTA TAT GGA GAT AAT TTT GGT       479
His Pro Ser Tyr His Arg Pro Gly Ser Leu Tyr Gly Asp Asn Phe Gly
145                 150                 155

GCT TTT GGT GAT AAT CAG TTC AGA TAC ACA CTC CTT TGC TAT GCT GCA       527
Ala Phe Gly Asp Asn Gln Phe Arg Tyr Thr Leu Leu Cys Tyr Ala Ala
160                 165                 170                 175

TGC GAG GCC CCA CTA ATC CTT GAA TTG GGA GGA TAT ATT TAT GGA CAG       575
Cys Glu Ala Pro Leu Ile Leu Glu Leu Gly Gly Tyr Ile Tyr Gly Gln
                180                 185                 190

AAT TGC ATG TTT GTT GTG AAC GAT TGG CAT GCC AGC CTT GTG CCA GTC       623
Asn Cys Met Phe Val Val Asn Asp Trp His Ala Ser Leu Val Pro Val
        195                 200                 205

CTT CTT GCT GCA AAA TAT AGA CCA TAC GGT GTT TAC AGA GAT TCC CGC       671
Leu Leu Ala Ala Lys Tyr Arg Pro Tyr Gly Val Tyr Arg Asp Ser Arg
    210                 215                 220

AGC ACC CTT GTT ATA CAT AAT TTA GCA CAT CAG GGT GTG GAG CCT GCA       719
Ser Thr Leu Val Ile His Asn Leu Ala His Gln Gly Val Glu Pro Ala
225                 230                 235
```

```
AGT ACA TAT CCT GAT CTG GGA TTG CCT CCT GAA TGG TAT GGA GCT TTA      767
Ser Thr Tyr Pro Asp Leu Gly Leu Pro Pro Glu Trp Tyr Gly Ala Leu
240                 245                 250                 255

GAA TGG GTA TTT CCA GAA TGG GCA AGG AGG CAT GCC CTT GAC AAG GGT      815
Glu Trp Val Phe Pro Glu Trp Ala Arg Arg His Ala Leu Asp Lys Gly
                260                 265                 270

GAG GCA GTT AAC TTT TTG AAA GGA GCA GTT GTG ACA GCA GAT CGG ATT      863
Glu Ala Val Asn Phe Leu Lys Gly Ala Val Val Thr Ala Asp Arg Ile
            275                 280                 285

GTG ACC GTC AGT CAG GGT TAT TCA TGG GAG GTC ACA ACT GCT GAA GGT      911
Val Thr Val Ser Gln Gly Tyr Ser Trp Glu Val Thr Thr Ala Glu Gly
        290                 295                 300

GGA CAG GGC CTC AAT GAG CTC TTA AGC TCC CGA AAA AGT GTA TTG AAT      959
Gly Gln Gly Leu Asn Glu Leu Leu Ser Ser Arg Lys Ser Val Leu Asn
    305                 310                 315

GGA ATT GTA AAT GGA ATT GAC ATT AAT GAT TGG AAC CCC ACC ACA GAC     1007
Gly Ile Val Asn Gly Ile Asp Ile Asn Asp Trp Asn Pro Thr Thr Asp
320                 325                 330                 335

AAG TGT CTC CCT CAT CAT TAT TCT GTC GAT GAC CTC TCT GGA AAG GCC     1055
Lys Cys Leu Pro His His Tyr Ser Val Asp Asp Leu Ser Gly Lys Ala
                340                 345                 350

AAA TGT AAA GCT GAA TTG CAG AAG GAG TTG GGT TTA CCT GTA AGG GAG     1103
Lys Cys Lys Ala Glu Leu Gln Lys Glu Leu Gly Leu Pro Val Arg Glu
            355                 360                 365

GAT GTT CCT CTG ATT GGC TTT ATT GGA AGA CTG GAT TAC CAG AAA GGC     1151
Asp Val Pro Leu Ile Gly Phe Ile Gly Arg Leu Asp Tyr Gln Lys Gly
        370                 375                 380

ATT GAT CTC ATT AAA ATG GCC ATT CCA GAG CTC ATG AGG GAG GAC GTG     1199
Ile Asp Leu Ile Lys Met Ala Ile Pro Glu Leu Met Arg Glu Asp Val
    385                 390                 395

CAA TTT GTC ATG CTT GGA TCT GGG GAT CCA ATT TTT GAA GGC TGG ATG     1247
Gln Phe Val Met Leu Gly Ser Gly Asp Pro Ile Phe Glu Gly Trp Met
400                 405                 410                 415

AGA TCT ACC GAG TCG AGT TAC AAG GAT AAA TTC CGT GGA TGG GTT GGA     1295
Arg Ser Thr Glu Ser Ser Tyr Lys Asp Lys Phe Arg Gly Trp Val Gly
                420                 425                 430

TTT AGT GTT CCA GTT TCC CAC AGA ATA ACT GCA GGT TGC GAT ATA TTG     1343
Phe Ser Val Pro Val Ser His Arg Ile Thr Ala Gly Cys Asp Ile Leu
            435                 440                 445

TTA ATG CCA TCG AGA TTT GAA CCT TGC GGT CTT AAT CAG CTA TAT GCT     1391
Leu Met Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu Asn Gln Leu Tyr Ala
        450                 455                 460
```

```
ATG CAA TAT GGT ACA GTT CCT GTA GTT CAT GGA ACT GGG GGC CTC CGA      1439
Met Gln Tyr Gly Thr Val Pro Val Val His Gly Thr Gly Gly Leu Arg
    465                 470                 475

GAC ACA GTC GAG ACC TTC AAC CCT TTT GGT GCA AAA GGA GAG GAG GGT      1487
Asp Thr Val Glu Thr Phe Asn Pro Phe Gly Ala Lys Gly Glu Glu Gly
480                 485                 490                 495

ACA GGG TGG GCG TTC TCA CCG CTA ACC GTG GAC AAG ATG TTG TGG GCA      1535
Thr Gly Trp Ala Phe Ser Pro Leu Thr Val Asp Lys Met Leu Trp Ala
            500                 505                 510

TTG CGA ACC GCG ATG TCG ACA TTC AGG GAG CAC AAG CCG TCC TGG GAG      1583
Leu Arg Thr Ala Met Ser Thr Phe Arg Glu His Lys Pro Ser Trp Glu
        515                 520                 525

GGG CTC ATG AAG CGA GGC ATG ACG AAA GAC CAT ACG TGG GAC CAT GCC      1631
Gly Leu Met Lys Arg Gly Met Thr Lys Asp His Thr Trp Asp His Ala
    530                 535                 540

CCG AGC AGT ACG AGC AGA TCT TCG AGT GGG CCT TCG TGG ACC AAC CCT      1679
Pro Ser Ser Thr Ser Arg Ser Ser Ser Gly Pro Ser Trp Thr Asn Pro
545                 550                 555

ACG TCA TGT AGA CGG GGA CTG GGG AGG TCC AAG TGC GAG TCT CCT TCA      1727
Thr Ser Cys Arg Arg Gly Leu Gly Arg Ser Lys Cys Glu Ser Pro Ser
560                 565                 570                 575

GCT CTG AAG ACA TCC TCT TCA TCC TTC CGC GGC CCG GAA GGA TAC CCC      1775
Ala Leu Lys Thr Ser Ser Ser Ser Phe Arg Gly Pro Glu Gly Tyr Pro
            580                 585                 590

TGT ACA TTG CGT TGT CCT GCT ACA GTA GAG TCG CAA TGC GCC TGC TTG      1823
Cys Thr Leu Arg Cys Pro Ala Thr Val Glu Ser Gln Cys Ala Cys Leu
        595                 600                 605

CTT TGG TTC GCC GGT TCG AGA ACA TAT GAC GGC TGT GCT GCT GCG GCG      1871
Leu Trp Phe Ala Gly Ser Arg Thr Tyr Asp Gly Cys Ala Ala Ala Ala
    610                 615                 620

GTG ACA GCT TCG GGT GGA CGA CAG TTA CAG TTT TGG GGA ATA AGG AAG      1919
Val Thr Ala Ser Gly Gly Arg Gln Leu Gln Phe Trp Gly Ile Arg Lys
625                 630                 635

GGA TGT GCT GCA GGA TGG TTA ACA GCA AAG CAC CAC TCA GAT GGC AGC      1967
Gly Cys Ala Ala Gly Trp Leu Thr Ala Lys His His Ser Asp Gly Ser
640                 645                 650                 655

CTC TCT GTC CGT GTT ACA GCT GAA ATC AGA AAC CAA CTG GTG ACT CTT TA   2017
Leu Ser Val Arg Val Thr Ala Glu Ile Arg Asn Gln Leu Val Thr Leu
            660                 665                 670

GCCTTAGTGA TTGTGAAGTT TGTTGCCTTC TGTGTATGTT GTCTTGTCCT TAGCTGACAA   2077

ATATTTGACC TGTTGGAGAA TTTTATCTTT GCTGCTGTTT TTTTTTAATC AAAAGAGGGG   2137

GTTTCCTCCG ATTTCATTAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA   2197
```

AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AA 2239

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA.
(A) LÄNGE: 671 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NO: 2:

```
Thr Gln Pro Pro Leu Pro Asp Ala Gly Val Gly Glu Leu Ala Pro Asp
 1               5                  10                  15

Leu Leu Leu Glu Gly Ile Ala Glu Asp Ser Ile Asp Ser Ile Ile Val
            20                  25                  30

Ala Ala Ser Glu Gln Asp Ser Glu Ile Met Asp Ala Asn Glu Gln Pro
        35                  40                  45

Gln Ala Lys Val Thr Arg Ser Ile Val Phe Val Thr Gly Glu Ala Ala
    50                  55                  60

Pro Tyr Ala Lys Ser Gly Gly Leu Gly Asp Val Cys Gly Ser Leu Pro
65                  70                  75                  80

Ile Ala Leu Ala Ala Arg Gly His Arg Val Met Val Val Met Pro Arg
                85                  90                  95

Tyr Leu Asn Gly Ser Ser Asp Lys Asn Tyr Ala Lys Ala Leu Tyr Thr
            100                 105                 110

Ala Lys His Ile Lys Ile Pro Cys Phe Gly Gly Ser His Glu Val Thr
        115                 120                 125

Phe Phe His Glu Tyr Arg Asp Asn Val Asp Trp Val Phe Val Asp His
    130                 135                 140

Pro Ser Tyr His Arg Pro Gly Ser Leu Tyr Gly Asp Asn Phe Gly Ala
145                 150                 155                 160

Phe Gly Asp Asn Gln Phe Arg Tyr Thr Leu Leu Cys Tyr Ala Ala Cys
                165                 170                 175

Glu Ala Pro Leu Ile Leu Glu Leu Gly Gly Tyr Ile Tyr Gly Gln Asn
            180                 185                 190

Cys Met Phe Val Val Asn Asp Trp His Ala Ser Leu Val Pro Val Leu
        195                 200                 205

Leu Ala Ala Lys Tyr Arg Pro Tyr Gly Val Tyr Arg Asp Ser Arg Ser
    210                 215                 220

Thr Leu Val Ile His Asn Leu Ala His Gln Gly Val Glu Pro Ala Ser
225                 230                 235                 240
```

```
Thr Tyr Pro Asp Leu Gly Leu Pro Pro Glu Trp Tyr Gly Ala Leu Glu
                245                 250                 255

Trp Val Phe Pro Glu Trp Ala Arg Arg His Ala Leu Asp Lys Gly Glu
            260                 265                 270

Ala Val Asn Phe Leu Lys Gly Ala Val Val Thr Ala Asp Arg Ile Val
        275                 280                 285

Thr Val Ser Gln Gly Tyr Ser Trp Glu Val Thr Thr Ala Glu Gly Gly
    290                 295                 300

Gln Gly Leu Asn Glu Leu Leu Ser Ser Arg Lys Ser Val Leu Asn Gly
305                 310                 315                 320

Ile Val Asn Gly Ile Asp Ile Asn Asp Trp Asn Pro Thr Thr Asp Lys
                325                 330                 335

Cys Leu Pro His His Tyr Ser Val Asp Asp Leu Ser Gly Lys Ala Lys
            340                 345                 350

Cys Lys Ala Glu Leu Gln Lys Glu Leu Gly Leu Pro Val Arg Glu Asp
        355                 360                 365

Val Pro Leu Ile Gly Phe Ile Gly Arg Leu Asp Tyr Gln Lys Gly Ile
    370                 375                 380

Asp Leu Ile Lys Met Ala Ile Pro Glu Leu Met Arg Glu Asp Val Gln
385                 390                 395                 400

Phe Val Met Leu Gly Ser Gly Asp Pro Ile Phe Glu Gly Trp Met Arg
                405                 410                 415

Ser Thr Glu Ser Ser Tyr Lys Asp Lys Phe Arg Gly Trp Val Gly Phe
            420                 425                 430

Ser Val Pro Val Ser His Arg Ile Thr Ala Gly Cys Asp Ile Leu Leu
        435                 440                 445

Met Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu Asn Gln Leu Tyr Ala Met
    450                 455                 460

Gln Tyr Gly Thr Val Pro Val Val His Gly Thr Gly Gly Leu Arg Asp
465                 470                 475                 480

Thr Val Glu Thr Phe Asn Pro Phe Gly Ala Lys Gly Glu Glu Gly Thr
                485                 490                 495

Gly Trp Ala Phe Ser Pro Leu Thr Val Asp Lys Met Leu Trp Ala Leu
            500                 505                 510

Arg Thr Ala Met Ser Thr Phe Arg Glu His Lys Pro Ser Trp Glu Gly
        515                 520                 525

Leu Met Lys Arg Gly Met Thr Lys Asp His Thr Trp Asp His Ala Pro
    530                 535                 540
```

```
Ser Ser Thr Ser Arg Ser Ser Ser Gly Pro Ser Trp Thr Asn Pro Thr
545                 550                 555                 560

Ser Cys Arg Arg Gly Leu Gly Arg Ser Lys Cys Glu Ser Pro Ser Ala
                565                 570                 575

Leu Lys Thr Ser Ser Ser Ser Phe Arg Gly Pro Glu Gly Tyr Pro Cys
            580                 585                 590

Thr Leu Arg Cys Pro Ala Thr Val Glu Ser Gln Cys Ala Cys Leu Leu
        595                 600                 605

Trp Phe Ala Gly Ser Arg Thr Tyr Asp Gly Cys Ala Ala Ala Ala Val
    610                 615                 620

Thr Ala Ser Gly Gly Arg Gln Leu Gln Phe Trp Gly Ile Arg Lys Gly
625                 630                 635                 640

Cys Ala Ala Gly Trp Leu Thr Ala Lys His His Ser Asp Gly Ser Leu
                645                 650                 655

Ser Val Arg Val Thr Ala Glu Ile Arg Asn Gln Leu Val Thr Leu
            660                 665                 670
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA.
- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nucleinsäure
- (A) Beschreibung. /desc = "Oligonucleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NO: 3:

```
ACAGGATCCT GTGCTATGCG GCGTGTGAAG                                    30
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA.
- (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nucleinsäure
- (A) Beschreibung. /desc = "Oligonucleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NO: 4:

```
TTGGGATCCG CAATGCCCAC AGCATTTTTT TC                                    32
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 2825 Basenpaare
(B) TYP: Nucleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(E) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA zu RNA

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(iv) ANTISENSE: Nein

(vi) ORIGINALQUELLE:
(A) ORGANISMUS: Triticum aestivum L.
(B) STAMM: cv. Florida
(F) GEWEBEART: ca. 21 d-Caryopsen

(vii) UNMITTELBARE QUELLE:
(A) BIBLIOTHEK: cDNA-Bibliothek in pBluescript sk ( - )
(B) CLON: pTaSSS1

(ix) EIGENSCHAFT:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(C) LAGE: 162 . . 2559

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NO: 5:

```
CTTCGGCCTG ACCCCGTTCG TTTACCCCCA CACAGAGCAC ACTCCAGTCC AGTCCAGCCC      60

ACTGCCACCG CGCTACTCTC CACTCCCACT GCCACCACCT CCGCCTGCGC CGCGCTCTGG     120

GCGGACCAAC CCGCGAACCG TACCATCTCC CGCCCCGATC C ATG TCG TCG GCG          173
                                              Met Ser Ser Ala
                                                  675

GTC GCG TCC GCC GCA TCC TTC CTC GCG CTC GCG TCA GCC TCC CCC GGG        221
Val Ala Ser Ala Ala Ser Phe Leu Ala Leu Ala Ser Ala Ser Pro Gly
        680                 685                 690

AGA TCA CGC AGG CGG GCG AGG GTG AGC GCG CAG CCA CCC CAC GCC GGG        269
Arg Ser Arg Arg Arg Ala Arg Val Ser Ala Gln Pro Pro His Ala Gly
    695                 700                 705

GCC GGC AGG TTG CAC TGG CCG CCG TGG CCG CCG CAG CGC ACG GCT CGC ...    317
Ala Gly Arg Leu His Trp Pro Pro Trp Pro Pro Gln Arg Thr Ala Arg
  710                 715                 720
```

```
GAC GGA GCT GTG GCG GCG CTC GCC GCC GGG AAG AAG GAC GCG GGG ATC      365
Asp Gly Ala Val Ala Ala Leu Ala Ala Gly Lys Lys Asp Ala Gly Ile
    725                 730                 735

GAC GAC GCC GCC GCG TCC GTG AGG CAG CCC CGC GCA CTC CGC GGT GGC      413
Asp Asp Ala Ala Ala Ser Val Arg Gln Pro Arg Ala Leu Arg Gly Gly
740                 745                 750                 755

GCC GCC ACC AAG GTC GCG GAG CGA AGG GAT CCC GTC AAG ACG CTC GAC      461
Ala Ala Thr Lys Val Ala Glu Arg Arg Asp Pro Val Lys Thr Leu Asp
                760                 765                 770

CGC GAC GCC GCG GAA GGC GGC GGG CCG TCC CCG CCG GCA GCG AGG CAG      509
Arg Asp Ala Ala Glu Gly Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ala Ala Arg Gln
            775                 780                 785

GAC GCC GCC CGT CCG CCG AGT ATG AAC GGC ATG CCG GTG AAC GGC GAG      557
Asp Ala Ala Arg Pro Pro Ser Met Asn Gly Met Pro Val Asn Gly Glu
        790                 795                 800

AAC AAA TCT ACC GGC GGC GGC GGC GCG ACT AAA GAC AGC GGG CTG CCC      605
Asn Lys Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ala Thr Lys Asp Ser Gly Leu Pro
    805                 810                 815

ACG CCC GCA CGC GCG CCC CAT CCG TCG ACC CAG AAC AGA GCA CCG GTG      653
Thr Pro Ala Arg Ala Pro His Pro Ser Thr Gln Asn Arg Ala Pro Val
820                 825                 830                 835

AAC GGT GAA AAC AAA GCT AAC GTC GCC TCG CCG CCG ACG AGC ATA GCC      701
Asn Gly Glu Asn Lys Ala Asn Val Ala Ser Pro Pro Thr Ser Ile Ala
                840                 845                 850

GAG GCC GCG GCT TCG GAT TCC GCA GCT ACC ATT TCC ATC AGC GAC AAG      749
Glu Ala Ala Ala Ser Asp Ser Ala Ala Thr Ile Ser Ile Ser Asp Lys
            855                 860                 865

GCG CCG GAG TCC GTT GTC CCA GCT GAG AAG ACG CCG CCG TCG TCC GGC      797
Ala Pro Glu Ser Val Val Pro Ala Glu Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly
        870                 875                 880

TCA AAT TTC GAG TCC TCG GCC TCT GCT CCC GGG TCT GAC ACT GTC AGC      845
Ser Asn Phe Glu Ser Ser Ala Ser Ala Pro Gly Ser Asp Thr Val Ser
    885                 890                 895

GAC GTG GAA CAA GAA CTG AAG AAG GGT GCG GTC GTT GTC GAA GAA GCT      893
Asp Val Glu Gln Glu Leu Lys Lys Gly Ala Val Val Val Glu Glu Ala
900                 905                 910                 915

CCA AAG CCA AAG GCT CTT TCG CCG CCT GCA GCC CCC GCT GTA CAA GAA      941
Pro Lys Pro Lys Ala Leu Ser Pro Pro Ala Ala Pro Ala Val Gln Glu
                920                 925                 930

GAC CTT TGG GAT TTC AAG AAA TAC ATT GGT TTC GAG GAG CCC GTG GAG      989
Asp Leu Trp Asp Phe Lys Lys Tyr Ile Gly Phe Glu Glu Pro Val Glu
            935                 940                 945
```

```
GCC AAG GAT GAT GGC CGG GCT GTC GCA GAT GAT GCG GGC TCC TTT GAA      1037
Ala Lys Asp Asp Gly Arg Ala Val Ala Asp Asp Ala Gly Ser Phe Glu
        950                 955                 960

CAC CAC CAG AAT CAC GAC TCC GGA CCT TTG GCA GGG GAG AAT GTC ATG      1085
His His Gln Asn His Asp Ser Gly Pro Leu Ala Gly Glu Asn Val Met
    965                 970                 975

AAC GTG GTC GTC GTG GCT GCT GAG TGT TCT CCC TGG TGC AAA ACA GGT      1133
Asn Val Val Val Val Ala Ala Glu Cys Ser Pro Trp Cys Lys Thr Gly
980                 985                 990                 995

GGT CTG GGA GAT GTT GCG GGT GCT CTG CCC AAG GCT TTG GCA AAG AGA      1181
Gly Leu Gly Asp Val Ala Gly Ala Leu Pro Lys Ala Leu Ala Lys Arg
                1000                1005                1010

GGA CAT CGT GTT ATG GTT GTG GTA CCA AGG TAT GGG GAC TAT GAA GAA      1229
Gly His Arg Val Met Val Val Val Pro Arg Tyr Gly Asp Tyr Glu Glu
            1015                1020                1025

GCC TAC GAT GTC GGA GTC CGA AAA TAC TAC AAG GCT GCT GGA CAG GAT      1277
Ala Tyr Asp Val Gly Val Arg Lys Tyr Tyr Lys Ala Ala Gly Gln Asp
        1030                1035                1040

ATG GAA GTG AAT TAT TTC CAT GCT TAT ATC GAT GGA GTT GAT TTT GTG      1325
Met Glu Val Asn Tyr Phe His Ala Tyr Ile Asp Gly Val Asp Phe Val
    1045                1050                1055

TTC ATT GAC GCT CCT CTC TTC CGA CAC CGT CAG GAA GAC ATT TAT GGG      1373
Phe Ile Asp Ala Pro Leu Phe Arg His Arg Gln Glu Asp Ile Tyr Gly
1060                1065                1070                1075

GGC AGC AGA CAG GAA ATT ATG AAG CGC ATG ATT TTG TTC TGC AAG GCC      1421
Gly Ser Arg Gln Glu Ile Met Lys Arg Met Ile Leu Phe Cys Lys Ala
                1080                1085                1090

GCT GTT GAG GTT CCA TGG CAC GTT CCA TGC GGC GGT GTC CCT TAT GGG      1469
Ala Val Glu Val Pro Trp His Val Pro Cys Gly Gly Val Pro Tyr Gly
            1095                1100                1105

GAT GGA AAT CTG GTG TTT ATT GCA AAT GAT TGG CAC ACG GCA CTC CTG      1517
Asp Gly Asn Leu Val Phe Ile Ala Asn Asp Trp His Thr Ala Leu Leu
        1110                1115                1120

CCT GTC TAT CTG AAA GCA TAT TAC AGG GAC CAT GGT TTG ATG CAG TAC      1565
Pro Val Tyr Leu Lys Ala Tyr Tyr Arg Asp His Gly Leu Met Gln Tyr
    1125                1130                1135

ACT CGG TCC ATT ATG GTG ATA CAT AAC ATC GCT CAC CAG GGC CGT GGC      1613
Thr Arg Ser Ile Met Val Ile His Asn Ile Ala His Gln Gly Arg Gly
1140                1145                1150                1155

CCT GTA GAT GAA TTC CCG TTC ACC GAG TTG CCT GAG CAC TAC CTG GAA      1661
Pro Val Asp Glu Phe Pro Phe Thr Glu Leu Pro Glu His Tyr Leu Glu
                1160                1165                1170
```

```
CAC TTC AGA CTG TAC GAC CCC GTG GGT GGT GAA CAC GCC AAC TAC TTC      1709
His Phe Arg Leu Tyr Asp Pro Val Gly Gly Glu His Ala Asn Tyr Phe
            1175                1180                1185

GCC GCC GGC CTG AAG ATG GCG GAC CAG GTT GTC GTG GTG AGC CCC GGG      1757
Ala Ala Gly Leu Lys Met Ala Asp Gln Val Val Val Val Ser Pro Gly
        1190                1195                1200

TAC CTG TGG GAG CTG AAG ACG GTG GAG GGC GGC TGG GGG CTT CAC GAC      1805
Tyr Leu Trp Glu Leu Lys Thr Val Glu Gly Gly Trp Gly Leu His Asp
    1205                1210                1215

ATC ATA CGG CAG AAC GAC TGG AAG ACC CGC GGC ATC GTC AAC GGC ATC      1853
Ile Ile Arg Gln Asn Asp Trp Lys Thr Arg Gly Ile Val Asn Gly Ile
1220                1225                1230                1235

GAC AAC ATG GAG TGG AAC CCC GAG GTG GAC GCC CAC CTC AAG TCG GAC      1901
Asp Asn Met Glu Trp Asn Pro Glu Val Asp Ala His Leu Lys Ser Asp
            1240                1245                1250

GGC TAC ACC AAC TTC TCC CTG AGG ACG CTG GAC TCC GGC AAG CGG CAG      1949
Gly Tyr Thr Asn Phe Ser Leu Arg Thr Leu Asp Ser Gly Lys Arg Gln
            1255                1260                1265

TGC AAG GAG GCC CTG CAG CGC GAG CTG GGC CTG CAG GTC CGC GCC GAC      1997
Cys Lys Glu Ala Leu Gln Arg Glu Leu Gly Leu Gln Val Arg Ala Asp
        1270                1275                1280

GTG CCG CTG CTC GGC TTC ATC GGC CGC CTG GAC GGG CAG AAG GGC GTG      2045
Val Pro Leu Leu Gly Phe Ile Gly Arg Leu Asp Gly Gln Lys Gly Val
    1285                1290                1295

GAG ATC ATC GCG GAC GCC ATG CCC TGG ATC GTG AGC CAG GAC GTG CAG      2093
Glu Ile Ile Ala Asp Ala Met Pro Trp Ile Val Ser Gln Asp Val Gln
1300                1305                1310                1315

CTG GTG ATG CTG GGC ACC GGG CGC CAC GAC CTG GAG AGC ATG CTG CAG      2141
Leu Val Met Leu Gly Thr Gly Arg His Asp Leu Glu Ser Met Leu Gln
            1320                1325                1330

CAC TTC GAG CGG GAG CAC CAC GAC AAG GTG CGC GGG TGG GTG GGG TTC      2189
His Phe Glu Arg Glu His His Asp Lys Val Arg Gly Trp Val Gly Phe
            1335                1340                1345

TCC GTG CGC CTG GCG CAC CGG ATC ACG GCG GGG GCG GAC GCG CTC CTC      2237
Ser Val Arg Leu Ala His Arg Ile Thr Ala Gly Ala Asp Ala Leu Leu
        1350                1355                1360

ATG CCC TCC CGG TTC GAG CCG TGC GGG CTG AAC CAG CTC TAC GCC ATG      2285
Met Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu Asn Gln Leu Tyr Ala Met
    1365                1370                1375

GCC TAC GGC ACC GTC CCC GTC GTG CAC GCC GTC GGC GGC CTC AGG GAC      2333
Ala Tyr Gly Thr Val Pro Val Val His Ala Val Gly Gly Leu Arg Asp
1380                1385                1390                1395
```

```
ACC GTG CCG CCG TTC GAC CCC TTC AAC CAC TCC GGG CTC GGG TGG ACG      2381
Thr Val Pro Pro Phe Asp Pro Phe Asn His Ser Gly Leu Gly Trp Thr
                1400                1405                1410

TTC GAC CGC GCC GAG GCG CAC AAG CTG ATC GAG GCG CTC GGG CAC TGC      2429
Phe Asp Arg Ala Glu Ala His Lys Leu Ile Glu Ala Leu Gly His Cys
            1415                1420                1425

CTC CGC ACC TAC CGA GAC TTC AAG GAG AGC TGG AGG GCC CTC CAG GAG      2477
Leu Arg Thr Tyr Arg Asp Phe Lys Glu Ser Trp Arg Ala Leu Gln Glu
        1430                1435                1440

CGC GGC ATG TCG CAG GAC TTC AGC TGG GAG CAC GCC GCC AAG CTC TAC      2525
Arg Gly Met Ser Gln Asp Phe Ser Trp Glu His Ala Ala Lys Leu Tyr
    1445                1450                1455

GAG GAC GTC CTC GTC AAG GCC AAG TAC CAG TGG  T GAACGCTAGC            2569
Glu Asp Val Leu Val Lys Ala Lys Tyr Gln Trp
1460                1465                1470

TGCTAGCCGC TCCAGCCCCG CATGCGTGCA TGACAGGATG GAACTGCATT GCGCACGCAG    2629

GAAAGTGCCA TGGAGCGCCG GCATCCGCGA AGTACAGTGA CATGAGGTGT GTGTGGTTGA    2689

GACGCTGATT CCAATCCGGC CCGTAGCAGA GTAGAGCGGA GGTATATGGG AATCTTAACT    2749

TGGTATTGTA ATTTGTTATG TTGTGTGCAT TATTACAATG TTGTTACTTA TTCTTGTTAA    2809

AAAAAAAAAA AAAAAA                                                    2825
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA.
- (A) LÄNGE: 799 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NO: 6:

```
Met Ser Ser Ala Val Ala Ser Ala Ala Ser Phe Leu Ala Leu Ala Ser
 1               5                  10                  15

Ala Ser Pro Gly Arg Ser Arg Arg Arg Ala Arg Val Ser Ala Gln Pro
            20                  25                  30

Pro His Ala Gly Ala Gly Arg Leu His Trp Pro Pro Trp Pro Pro Gln
        35                  40                  45

Arg Thr Ala Arg Asp Gly Ala Val Ala Ala Leu Ala Ala Gly Lys Lys
    50                  55                  60

Asp Ala Gly Ile Asp Asp Ala Ala Ala Ser Val Arg Gln Pro Arg Ala
65                  70                  75                  80
```

```
Leu Arg Gly Gly Ala Ala Thr Lys Val Ala Glu Arg Arg Asp Pro Val
                85                  90                  95

Lys Thr Leu Asp Arg Asp Ala Ala Glu Gly Gly Gly Pro Ser Pro Pro
            100                 105                 110

Ala Ala Arg Gln Asp Ala Ala Arg Pro Pro Ser Met Asn Gly Met Pro
        115                 120                 125

Val Asn Gly Glu Asn Lys Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ala Thr Lys Asp
    130                 135                 140

Ser Gly Leu Pro Thr Pro Ala Arg Ala Pro His Pro Ser Thr Gln Asn
145                 150                 155                 160

Arg Ala Pro Val Asn Gly Glu Asn Lys Ala Asn Val Ala Ser Pro Pro
                165                 170                 175

Thr Ser Ile Ala Glu Ala Ala Ala Ser Asp Ser Ala Ala Thr Ile Ser
            180                 185                 190

Ile Ser Asp Lys Ala Pro Glu Ser Val Val Pro Ala Glu Lys Thr Pro
        195                 200                 205

Pro Ser Ser Gly Ser Asn Phe Glu Ser Ser Ala Ser Ala Pro Gly Ser
    210                 215                 220

Asp Thr Val Ser Asp Val Glu Gln Glu Leu Lys Lys Gly Ala Val Val
225                 230                 235                 240

Val Glu Glu Ala Pro Lys Pro Lys Ala Leu Ser Pro Pro Ala Ala Pro
                245                 250                 255

Ala Val Gln Glu Asp Leu Trp Asp Phe Lys Lys Tyr Ile Gly Phe Glu
            260                 265                 270

Glu Pro Val Glu Ala Lys Asp Asp Gly Arg Ala Val Ala Asp Asp Ala
        275                 280                 285

Gly Ser Phe Glu His His Gln Asn His Asp Ser Gly Pro Leu Ala Gly
    290                 295                 300

Glu Asn Val Met Asn Val Val Val Val Ala Ala Glu Cys Ser Pro Trp
305                 310                 315                 320

Cys Lys Thr Gly Gly Leu Gly Asp Val Ala Gly Ala Leu Pro Lys Ala
                325                 330                 335

Leu Ala Lys Arg Gly His Arg Val Met Val Val Val Pro Arg Tyr Gly
            340                 345                 350

Asp Tyr Glu Glu Ala Tyr Asp Val Gly Val Arg Lys Tyr Tyr Lys Ala
        355                 360                 365

Ala Gly Gln Asp Met Glu Val Asn Tyr Phe His Ala Tyr Ile Asp Gly
    370                 375                 380
```

```
Val Asp Phe Val Phe Ile Asp Ala Pro Leu Phe Arg His Arg Gln Glu
385                 390                 395                 400

Asp Ile Tyr Gly Gly Ser Arg Gln Glu Ile Met Lys Arg Met Ile Leu
                405                 410                 415

Phe Cys Lys Ala Ala Val Glu Val Pro Trp His Val Pro Cys Gly Gly
            420                 425                 430

Val Pro Tyr Gly Asp Gly Asn Leu Val Phe Ile Ala Asn Asp Trp His
        435                 440                 445

Thr Ala Leu Leu Pro Val Tyr Leu Lys Ala Tyr Tyr Arg Asp His Gly
    450                 455                 460

Leu Met Gln Tyr Thr Arg Ser Ile Met Val Ile His Asn Ile Ala His
465                 470                 475                 480

Gln Gly Arg Gly Pro Val Asp Glu Phe Pro Phe Thr Glu Leu Pro Glu
                485                 490                 495

His Tyr Leu Glu His Phe Arg Leu Tyr Asp Pro Val Gly Gly Glu His
            500                 505                 510

Ala Asn Tyr Phe Ala Ala Gly Leu Lys Met Ala Asp Gln Val Val Val
        515                 520                 525

Val Ser Pro Gly Tyr Leu Trp Glu Leu Lys Thr Val Glu Gly Gly Trp
    530                 535                 540

Gly Leu His Asp Ile Ile Arg Gln Asn Asp Trp Lys Thr Arg Gly Ile
545                 550                 555                 560

Val Asn Gly Ile Asp Asn Met Glu Trp Asn Pro Glu Val Asp Ala His
                565                 570                 575

Leu Lys Ser Asp Gly Tyr Thr Asn Phe Ser Leu Arg Thr Leu Asp Ser
            580                 585                 590

Gly Lys Arg Gln Cys Lys Glu Ala Leu Gln Arg Glu Leu Gly Leu Gln
        595                 600                 605

Val Arg Ala Asp Val Pro Leu Leu Gly Phe Ile Gly Arg Leu Asp Gly
    610                 615                 620

Gln Lys Gly Val Glu Ile Ile Ala Asp Ala Met Pro Trp Ile Val Ser
625                 630                 635                 640

Gln Asp Val Gln Leu Val Met Leu Gly Thr Gly Arg His Asp Leu Glu
                645                 650                 655

Ser Met Leu Gln His Phe Glu Arg Glu His His Asp Lys Val Arg Gly
            660                 665                 670

Trp Val Gly Phe Ser Val Arg Leu Ala His Arg Ile Thr Ala Gly Ala
        675                 680                 685
```

```
Asp Ala Leu Leu Met Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu Asn Gln
    690                 695                 700

Leu Tyr Ala Met Ala Tyr Gly Thr Val Pro Val Val His Ala Val Gly
705                 710                 715                 720

Gly Leu Arg Asp Thr Val Pro Pro Phe Asp Pro Phe Asn His Ser Gly
                725                 730                 735

Leu Gly Trp Thr Phe Asp Arg Ala Glu Ala His Lys Leu Ile Glu Ala
            740                 745                 750

Leu Gly His Cys Leu Arg Thr Tyr Arg Asp Phe Lys Glu Ser Trp Arg
        755                 760                 765

Ala Leu Gln Glu Arg Gly Met Ser Gln Asp Phe Ser Trp Glu His Ala
    770                 775                 780

Ala Lys Leu Tyr Glu Asp Val Leu Val Lys Ala Lys Tyr Gln Trp
785                 790                 795
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA.
- (A) LÄNGE: 12 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NO: 7:

```
Pro Trp Ser Lys Thr Gly Gly Leu Gly Asp Val Cys
1               5                  10
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA.
- (A) LÄNGE: 13 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NO: 8:

```
Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu Asn Gln Leu Tyr
1               5                   10
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA.
- (A) LÄNGE: 12 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NO: 9:

```
Gly Thr Gly Gly Leu Arg Asp Thr Val Glu Asn Cys
1               5                   10
```

**Patentansprüche**

1. Pflanzenzelle von transgenem Weizen, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Aktivität eines Proteins in dieser Pflanzenzelle reduziert ist, wobei das Protein codiert wird durch ein Nucleinsäuremolekül, welches eine Weizenstärkesynthase codiert, ausgewählt aus
(a) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, das die Aminosäuresequenz der Reste 62 bis 671 wie in SEQ ID NO: 2 gezeigt umfasst;
(b) Nucleinsäuremolekülen, umfassend die Nucleotidsequenz der Nucleotide 186 bis 2239 wie in SEQ ID NO: 1 gezeigt oder eine entsprechende Ribonucleotidsequenz;
(c) Nucleinsäuremolekülen, deren Sequenz eine Sequenzidentität von mehr als 90% zu der Nucleotidsequenz der Nucleotide 186 bis 2239 wie in SEQ ID NO: 1 gezeigt hat, und welche eine lösliche Stärkesynthase codieren; und
(d) Nucleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz durch die Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der Nucleinsäuremoleküle aufgeführt unter (c) abweicht,
und
wobei die Reduktion der Aktivität des Proteins in dieser Zelle erzielt wird durch
(i) die Einführung und Expression eines DNA-Moleküls, welches eine Antisense-RNA gegen Transkripte eines DNA Moleküls gemäß der Definition in Anspruch 1 codiert,
(ii) die Einführung und Expression eines DNA-Moleküls, das ein Ribozym codiert, welches speziell Transkripte schneidet, die das Polypeptid codieren; oder
(iii) die Einführung und Expression eines DNA-Moleküls, das eine Sense-RNA für Transkripte eines DNA-Mo-

leküls gemäß der Definition in Anspruch 1 codiert, zur Erzielung eines Cosuppressions-Effektes.

2. Weizenpflanze, enthaltend Pflanzenzellen nach Anspruch 1.

3. Vermehrungsmaterial einer Weizenpflanze nach Anspruch 2, enthaltend Zellen nach Anspruch 1.

4. DNA-Molekül umfassend
(a) eine DNA-Sequenz, die eine Antisense-RNA codiert, die komplementär ist zu Transkripten eines DNA-Moleküls gemäß der Definition in Anspruch 1, und
(b) regulatorische DNA-Elemente, welche die Transkription der DNA-Sequenz in Pflanzenzellen sicherstellen,
wobei die Expression des DNA-Moleküls in Weizenpflanzenzellen zu einer Reduktion der Expression einer Stärkesynthase in der Weizenpflanzenzelle führt, die durch ein Nucleinsäuremolekül gemäß der Definition in Anspruch 1 codiert wird.

5. DNA-Molekül umfassend
(a) eine DNA-Sequenz, die eine Sense-RNA zu Transkripten des DNA-Moleküls gemäß der Definition in Anspruch 1 codiert, und
(b) regulatorische DNA-Elemente, welche eine Transkription der DNA-Sequenz in Pflanzenzellen sicherstellen,
wobei die Expression des DNA-Moleküls in Weizenpflanzenzellen durch einen Cosuppressions-Effekt zu einer Reduktion der Expression einer Stärkesynthase in der Weizenpflanzenzelle führt, die durch ein Nucleinsäuremolekül gemäß der Definition in Anspruch 1 codiert wird.

6. Verfahren zur Herstellung einer Pflanzenzelle von transgenem Weizen nach Anspruch 1, umfassend den Schritt des Transformierens einer Weizenpflanzenzelle mit einem DNA-Molekül nach Anspruch 4 oder 5.

7. Verfahren zur Herstellung einer transgenen Weizenpflanze nach Anspruch 2, umfassend den Verfahrensschritt des Verfahrens nach Anspruch 6 und ferner den Schritt der Regeneration einer Pflanze aus der transformierten Weizenpflanzenzelle.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen