

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation⁶ : C12N 15/56, 15/82, 9/44, A01H 5/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/42328 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 13. November 1997 (13.11.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/02292 (22) Internationales Anmeldedatum: 6. Mai 1997 (06.05.97) (30) Prioritätsdaten: 196 18 125.9 6. Mai 1996 (06.05.96) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): PLANT-TEC BIOTECHNOLOGIE GMBH [DE/DE]; Hermannswerder 14, D-14473 Potsdam (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EMMERMANN, Michael [DE/DE]; Afrikanische Strasse 144c, D-13351 Berlin (DE). KOSSMANN, Jens [DE/DE]; Golmer Fichten 9, D-14476 Golm (DE). (74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER; Postfach 86 07 67, D-81634 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, HU, JP, PL, SI, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
(54) Title: NUCLEIC ACID MOLECULES WHICH CODE THE POTATO DEBRANCHING ENZYME (54) Bezeichnung: NUCLEINSÄUREMOLEKÜLE, DIE DEBRANCHING-ENZYME AUS KARTOFFEL CODIEREN (57) Abstract The description relates to nucleic acid molecules which code the potato debranching enzyme and transgenic plant cells and plants in which the synthesis of an amylopectin with modified properties occurs owing to the expression of a debranching enzyme from potatoes or the inhibition of such an endogenous debranching enzyme activity. (57) Zusammenfassung Es werden Nucleinsäuremoleküle beschrieben, die Debranching-Enzyme aus Kartoffel codieren, sowie transgene Pflanzenzellen und Pflanzen, in denen es aufgrund der Expression eines Debranching-Enzyms aus Kartoffel oder der Inhibition einer solchen endogenen Debranching-Enzymaktivität zur Synthese eines in seinen Eigenschaften veränderten Amylopektins kommt.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidsschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Nucleinsäuremoleküle, die Debranching-Enzyme aus Kartoffel codieren

Die vorliegende Erfindung betrifft Nucleinsäuremoleküle, die Proteine aus Kartoffel mit der enzymatischen Aktivität eines Debranching-Enzyms codieren. Ferner betrifft die Erfindung transgene Pflanzen und Pflanzenzellen, in denen es aufgrund der Expression einer zusätzlichen Debranching-Enzymaktivität aus Kartoffel oder der Inhibierung einer endogenen Debranching-Enzymaktivität zur Synthese eines Amylopektins mit einem veränderten Verzweigungsgrad kommt, sowie die aus den besagten transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen erhaltliche Stärke.

Stärke spielt sowohl als Speicherstoff in einer Vielzahl von Pflanzen als auch als nachwachsender, industriell verwertbarer Rohstoff eine wichtige Rolle und gewinnt zunehmend an Bedeutung. Für die industrielle Verwendung der Stärke ist es erforderlich, daß diese hinsichtlich der Struktur, Form und/oder sonstigen physikalisch-chemischen Parametern den Erfordernissen der verarbeitenden Industrie entspricht. Für den Einsatz in möglichst vielen Einsatzgebieten ist es darüber hinaus erforderlich, eine große Stoffvielfalt zu erreichen.

Das Polysaccharid Stärke ist aus chemisch einheitlichen Grundbausteinen, den Glucosemolekülen, aufgebaut, stellt jedoch ein komplexes Gemisch aus unterschiedlichen Molekülformen dar, die Unterschiede hinsichtlich des Polymerisationsgrades und des Auftretens von Verzweigungen aufweisen. Man unterscheidet die Amylose-Stärke, ein im wesentlichen unverzweigtes Polymer aus α -1,4-glycosidisch verknüpften Glucosemolekülen, von der Amylopektin-Stärke, ein verzweigtes Polymer, bei dem die Verzweigungen durch das Auftreten von zu-

sätzlichen α -1,6-glykosidischen Verknüpfungen zustande kommen.

In typischen für die Stärkeproduktion verwendeten Pflanzen, wie z.B. Mais oder Kartoffel, kommen die beiden Stärkeformen in einem Verhältnis von ca. 25 Teilen Amylose zu 75 Teilen Amylopektin vor. Neben dem Amylopektin kommt beispielsweise beim Mais ein weiteres verzweigtes Polysaccharid, das sogenannte Phytoglycogen, vor, das sich vom Amylopektin durch einen stärkeren Verzweigungsgrad und ein anderes Löslichkeitsverhalten unterscheidet (siehe z.B. Lee et al., Arch. Biochem. Biophys. 143 (1971), 365-374; Pan und Nelson, Plant Physiol. 74 (1984), 324-328). Im Rahmen dieser Anmeldung wird der Begriff Amylopektin so verwendet, daß er das Phytoglycogen umfaßt.

Im Hinblick auf die Einheitlichkeit des Grundstoffes Stärke für seine Anwendung im industriellen Bereich werden Stärkeproduzierende Pflanzen benötigt, die beispielsweise nur noch die Komponente Amylopektin oder nur noch die Komponente Amylose enthalten. Für eine Reihe weiterer Verwendungen werden Pflanzen benötigt, die unterschiedlich stark verzweigte Amylopektin-Formen synthetisieren.

Derartige Pflanzen können beispielsweise durch Züchtung oder Mutagenesetechniken erzeugt werden. Für bestimmte Pflanzenspezies, z.B. Mais, ist bekannt, daß durch Mutagenese Sorten erzeugt werden können, die nur noch Amylopektin bilden. Für die Kartoffel wurde ebenfalls durch chemische Mutagenese bei einer haploiden Linie ein Genotyp erzeugt, der keine Amylose bildet (Hovenkamp-Hermelink, Theor. Appl. Genet. 75 (1987), 217-221).

Neben den klassischen Züchtungs- und Mutagenesetechniken werden inzwischen zunehmend gentechnische Methoden angewendet, um gezielt in den Stärkemetabolismus stärkespeichernder Pflanzen einzugreifen. Voraussetzung hierfür ist, daß DNA-Sequenzen zur Verfügung stehen, die am Stärkemetabolismus beteiligte Enzyme codieren. Bei der Kartoffel sind beispielsweise inzwischen DNA-Sequenzen, die Stärkekorngebun-

dene Stärkesynthase oder Verzweigungsenzym (Q-Enzym) codieren, bekannt und zur gentechnischen Veränderung von Pflanzen verwendet worden.

Für eine weitere gezielte Veränderung der Stärke in Pflanzen, insbesondere des Verzweigungsgrades von in Pflanzen synthetisierter Stärke mit Hilfe gentechnischer Verfahren ist es nach wie vor erforderlich, DNA-Sequenzen zu identifizieren, die Enzyme codieren, die am Stärkemetabolismus, insbesondere der Verzweigung von Stärkemolekülen, beteiligt sind.

Neben den Q-Enzymen, die Verzweigungen in Stärkemoleküle einführen, kommen in Pflanzen Enzyme vor, die Verzweigungen auflösen können. Diese Enzyme werden als Debranching-Enzyme bezeichnet.

In Zuckerrübe konnte von Li et al. (Plant Physiol. 98 (1992), 1277-1284) neben fünf Endo- und zwei Exoamylasen nur ein Debranching-Enzym nachgewiesen werden. Dieses Enzym, das eine Größe von ca. 100 kD und ein pH-Optimum von 5,5 aufweist, ist in den Chloroplasten lokalisiert. Auch für Spinat wurde ein Debranching-Enzym beschrieben. Sowohl das Debranching-Enzym aus Spinat als auch das aus der Zuckerrübe besitzen bei der Reaktion mit Amylopektin als Substrat verglichen mit Pullulan als Substrat eine 5-fach geringere Aktivität (Ludwig et al., Plant Physiol. 74 (1984), 856-861; Li et al., Plant Physiol. 98 (1992), 1277-1284). Für Spinat wurde die Isolierung einer cDNA, die ein Debranching-Enzym codiert, beschrieben (Renz et al., Plant Physiol. 108 (1995), 1342).

Für Mais wurde in der Literatur die Existenz eines Debranching-Enzyms beschrieben. Die entsprechende Mutante wird als su (sugary) bezeichnet. Das Gen des sugary-Locus wurde kürzlich cloniert (siehe James et al., Plant Cell 7 (1995), 417-429).

Bei der landwirtschaftlich wichtigen stärkespeichernden Kulturpflanze Kartoffel wurde die Aktivität eines Debranching-Enzyms von Hobson et al. (J. Chem. Soc., (1951), 1451) un-

tersucht. Es gelang der Nachweis, daß das entsprechende Enzym im Gegensatz zum Q-Enzym keine kettenverlängernde Aktivität besitzt, sondern lediglich α -1,6-glycosidische Bindungen hydrolysiert. Es wurden bereits Verfahren zur Reinigung eines Debranching-Enzyms aus Kartoffel sowie partielle Peptidsequenzen des gereinigten Proteins beschrieben (WO 95/04826).

Es gab bisher keinerlei Hinweise, daß in Kartoffel weitere Debranching-Enzymformen vorkommen. Sollte dies der Fall sein, so müßte man für die Herstellung transgener Kartoffelpflanzen, die keinerlei Debranching-Enzymaktivität mehr aufweisen, z.B. um eine Veränderung des Verzweigungsgrades der Amylopektinstärke zu erzielen, alle in der Kartoffel vorkommenden Debranching-Enzymformen identifizieren und die entsprechenden Gene oder cDNA-Sequenzen isolieren.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, weitere möglicherweise bei Kartoffel vorkommende Debranching-Enzyme zu identifizieren bzw. entsprechende Nucleinsäuremoleküle, die diese Enzyme codieren, zu isolieren.

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung Nucleinsäuremoleküle, die Proteine mit der biologischen Aktivität eines Debranching-Enzyms aus Kartoffel codieren.

Ein derartiges Nucleinsäuremolekül codiert vorzugsweise ein Protein mit der biologischen Aktivität eines Debranching-Enzyms aus Kartoffel, das die unter Seq ID No. 2 angegebene Aminosäuresequenz aufweist. Besonders bevorzugt umfaßt ein derartiges Nucleinsäuremolekül die unter Seq ID No. 1 angegebene Nucleotidsequenz, insbesondere die codierende Region. Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls Nucleinsäuremoleküle, die Proteine mit der biologischen Aktivität eines Debranching-Enzyms aus Kartoffel codieren und die mit einem

der oben beschriebenen Nucleinsäuremoleküle bzw. deren komplementären Strang hybridisieren.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung Nucleinsäuremoleküle, deren Sequenzen sich aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von den Sequenzen der obengenannten Nucleinsäuremoleküle unterscheidet, und die ein Protein codieren, das die biologische Aktivität eines Debranching-Enzyms aus Kartoffel aufweist.

Der Begriff "aus Kartoffel" bedeutet, daß die durch die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codierten Debranching-Enzyme typisch sind für die Spezies *Solanum tuberosum*, d.h. entweder natürlicherweise in solchen Pflanzen vorkommen, beispielsweise codiert durch genomische oder RNA-Moleküle, oder von davon abgeleiteten Molekülen. Abgeleitete Moleküle können beispielsweise durch reverse Transkription von RNA-Molekülen, Amplifikation, Mutation, Deletion, Substitution, Insertion etc. erzeugt werden. D.h. der Begriff umfaßt auch Enzyme, die von Allelen oder Derivaten von natürlicherweise in Kartoffel vorkommenden Sequenzen codiert werden. Diese können beispielsweise durch gentechnische Methoden *in vivo* oder *in vitro* erzeugt werden.

Der Begriff "Hybridisierung" bedeutet im Rahmen dieser Erfindung eine Hybridisierung unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrock et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2. Aufl. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) beschrieben sind. Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisieren, können prinzipiell aus jeder beliebigen Kartoffelpflanze stammen.

Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Molekülen hybridisieren, können z.B. aus genomischen oder aus cDNA-Bibliotheken isoliert werden.

Die Identifizierung und Isolierung derartiger Nucleinsäuremoleküle kann dabei unter Verwendung der erfindungsgemäßen

Nucleinsäuremoleküle oder Teile dieser Moleküle bzw. der reversen Komplemente dieser Moleküle erfolgen, z.B. mittels Hybridisierung nach Standardverfahren (siehe z.B. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) oder durch Amplifikation mittels PCR.

Als Hybridisierungsprobe können z.B. Nucleinsäuremoleküle verwendet werden, die exakt die oder im wesentlichen die unter Seq ID No. 1 angegebene Nucleotidsequenz oder Teile dieser Sequenz aufweisen. Bei den als Hybridisierungsprobe verwendeten Fragmenten kann es sich auch um synthetische Fragmente handeln, die mit Hilfe der gängigen Synthesetechniken hergestellt wurden und deren Sequenz im wesentlichen mit der eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls übereinstimmt. Hat man Gene identifiziert und isoliert, die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuresequenzen hybridisieren, ist eine Bestimmung der Sequenz und eine Analyse der Eigenschaften der von dieser Sequenz codierten Proteine erforderlich.

Die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisierenden Moleküle umfassen insbesondere Fragmente, Derivate und allelische Varianten der oben beschriebenen DNA-Moleküle, die ein Protein codieren mit der enzymatischen Aktivität eines Debranching-Enzyms aus Kartoffel oder ein biologisch, d.h. enzymatisch aktives Fragment davon. Unter Fragmenten werden dabei Teile der Nucleinsäuremoleküle verstanden, die lang genug sind, um ein Polypeptid mit der enzymatischen Aktivität eines Debranching-Enzyms zu codieren. Der Ausdruck Derivat bedeutet in diesem Zusammenhang, daß die Sequenzen dieser Moleküle sich von den Sequenzen der oben beschriebenen Nucleinsäuremoleküle an einer oder mehreren Positionen unterscheiden und einen hohen Grad an Homologie zu diesen Sequenzen aufweisen. Homologie bedeutet dabei eine Sequenzidentität von mindestens 70 %, insbesondere eine Identität von mindestens 80 %, vorzugsweise über 90 % und besonders bevorzugt über 95 %. Die Abweichungen zu den oben beschriebenen Nucleinsäuremolekülen können dabei durch Deletion, Ad-

dition, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein.

Homologie bedeutet ferner, daß funktionelle und/oder strukturelle Äquivalenz zwischen den betreffenden Nucleinsäuremolekülen oder den durch sie codierten Proteinen, besteht. Bei den Nucleinsäuremolekülen, die homolog zu den oben beschriebenen Molekülen sind und Derivate dieser Moleküle darstellen, handelt es sich in der Regel um Variationen dieser Moleküle, die Modifikationen darstellen, die dieselbe biologische Funktion ausüben. Es kann sich dabei sowohl um natürlicherweise auftretende Variationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus anderen Kartoffelpflanzen oder -sorten, oder um Mutationen, wobei diese Mutationen auf natürliche Weise aufgetreten sein können oder durch gezielte Mutagenese eingeführt wurden. Ferner kann es sich bei den Variationen um synthetisch hergestellte Sequenzen handeln. Bei den allelischen Varianten kann es sich sowohl um natürlich auftretende Varianten handeln, als auch um synthetisch hergestellte oder durch rekombinante DNA-Techniken erzeugte Varianten.

Die von den verschiedenen Varianten der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codierten Proteine weisen bestimmte gemeinsame Charakteristika auf. Dazu können z.B. Enzymaktivität, Molekulargewicht, immunologische Reaktivität, Konformation etc. gehören, sowie physikalische Eigenschaften wie z.B. das Laufverhalten in Gelelektrophoresen, chromatographisches Verhalten, Sedimentationskoeffizienten, Löslichkeit, spektroskopische Eigenschaften, Stabilität; pH-Optimum, Temperatur-Optimum etc.

Der Nachweis der enzymatischen Aktivität des Debranching-Enzyms kann beispielsweise durch einen Färbetest erfolgen, wie in der WO 95/04826 beschrieben. Dieser beruht darauf, daß sich ein Protein mit einer stärkemodifizierenden Aktivität nachweisen läßt, wenn Proteinextrakte, beispielsweise aus Kartoffelknollen, in nicht-denaturierenden, amylopektinhaltigen Polyacrylamidgelen (PAAG) aufgetrennt werden und das Gel, nach Inkubation in einem geeigneten Puffer, an-

schließlich einer Jodfärbung unterzogen wird. Während unverzweigte Amylose mit Jod einen blauen Komplex bildet, ergibt Amylopektin eine rötlich-violette Färbung. In amylopektinhaltigen Polyacrylamidgelen, die mit Jod rötlich-violett färben, kommt es an Orten, an denen eine Debranching-Aktivität lokalisiert ist, zu einer Farbverschiebung hin zu einer Blaufärbung des Gels, da die Verzweigungen des violettfärbenden Amylopektins von dem Debranching-Enzym abgebaut werden.

Alternativ kann der Nachweis der Debranching-Enzymaktivität mit Hilfe des DNSS-Tests (siehe Ludwig et al., Plant Physiol. 74 (1984), 856-861) erfolgen.

Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können beliebige Nucleinsäuremoleküle sein, insbesondere DNA- oder RNA-Moleküle handeln, beispielsweise cDNA, genomische DNA, mRNA etc. Sie können natürlich vorkommende Moleküle sein, oder durch gentechnische oder chemische Syntheseverfahren hergestellte.

Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codieren ein bisher unbekanntes neues Protein aus Kartoffel mit der enzymatischen Aktivität eines Debranching-Enzyms. Bisher war für Kartoffel lediglich ein Debranching-Enzym beschrieben worden. In der Literatur gab es bisher keinerlei Hinweise, daß es in Kartoffel Gene gibt, die weitere Debranching-Enzyme codieren. Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß es neben dem bisher bekannten Debranching-Enzym in Kartoffel zumindest ein weiteres Enzym mit Debranching-Aktivität gibt. Somit codieren die erfindungsgemäßen Moleküle einen neuen Typ von Debranching-Enzymen aus Kartoffel. Mit Hilfe dieser Moleküle ist es nun möglich gezielt in den Stärkemetabolismus von Kartoffel und anderen stärkespeichernden Pflanzen einzugreifen und somit die Synthese einer in ihren chemischen oder physikalischen Eigenschaften modifizierten Stärke zu ermöglichen. Dies kann zum einen durch Überexpression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in beliebigen, vorzugsweise stärkespeichernden Pflanzen, erfolgen oder durch

Reduktion der Debranching-Enzymaktivität in Kartoffelpflanzen durch Einsatz der erfindungsgemäßen Nucleinsäuresequenzen, beispielsweise mittels antisense- oder Ribozymeffekte.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Nucleinsäuremoleküle von mindestens 15, vorzugsweise mehr als 50 und besonders bevorzugt mehr als 200 Basenpaaren Länge, die spezifisch mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisieren. Spezifisch hybridisieren bedeutet hierbei, daß diese Moleküle mit Nucleinsäuremolekülen hybridisieren, die die neuen Debranching-Enzyme aus Kartoffel codieren, jedoch nicht mit Nucleinsäuremolekülen, die andere Proteine codieren. Hybridisieren bedeutet dabei vorzugsweise Hybridisieren unter stringenten Bedingungen (s.o.). Insbesondere betrifft die Erfindung solche Nucleinsäuremoleküle, die mit Transkripten von erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisieren und dadurch deren Translation verhindern können. Solche Nucleinsäuremoleküle, die spezifisch mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisieren, können beispielsweise Bestandteile von mRNA-Konstrukten oder Ribozymen sein oder können als Primer für die Amplifikation mittels PCR verwendet werden.

Weiterhin betrifft die Erfindung Vektoren, insbesondere Plasmide, Cosmide, Viren, Bacteriophagen und andere in der Gentechnik gängige Vektoren, die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle enthalten.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die in den Vektoren enthaltenen Nucleinsäuremoleküle verknüpft mit regulatorischen Elementen, die die Transkription und Translation in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen gewährleisten.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Wirtszellen, insbesondere prokaryontische oder eukaryontische Zellen, die mit einem oben beschriebenen Nucleinsäuremolekül oder einem Vektor transformiert wurden, und Zellen,

die von derartigen Wirtszellen abstammen und die beschriebenen Nucleinsäuremoleküle oder Vektoren enthalten. Die Wirtszellen können Bakterien- oder Pilzzellen, sowie pflanzliche oder tierische Zellen sein.

Die Erfindung betrifft auch Proteine mit der biologischen Aktivität eines Debranching-Enzyms aus Kartoffel, die durch die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codiert werden, oder biologisch aktive Fragmente davon.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Herstellung eines Proteins mit der biologischen Aktivität eines Debranching-Enzyms aus Kartoffel oder eines biologisch aktiven Fragmentes davon, bei dem erfindungsgemäße Wirtszellen unter geeigneten Bedingungen kultiviert werden und das Protein aus der Kultur, d.h. aus den Zellen und/oder dem Kulturmedium gewonnen wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Wirtszellen transgene pflanzliche Zellen, die aufgrund der Gegenwart und Expression eines eingeführten erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls im Vergleich zu nichttransformierten Zellen entweder eine neue oder eine gesteigerte Debranching-Enzymaktivität aufweisen.

Durch die Bereitstellung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle besteht nun die Möglichkeit, pflanzliche Zellen mittels gentechnischer Methoden dahingehend zu verändern, daß sie eine neue oder eine gesteigerte Debranching-Enzymaktivität aufweisen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen.

Solche transgenen Pflanzenzellen unterscheiden sich von nicht-transformierten Zellen dadurch, daß das eingeführte Nucleinsäuremolekül entweder heterolog zu der transformierten Zelle ist, d.h. aus einer Zelle mit einem anderen genomischen Hintergrund stammt, oder dadurch daß das eingeführte Nucleinsäuremolekül, wenn es homolog zur transformierten Pflanzenspezies ist, im Genom an einem Ort lokalisiert ist, an dem es in nicht-transformierten Zellen natürlicherweise

nicht vorkommt. Dabei kann das eingeführte Nucleinsäuremolekül entweder unter der Kontrolle seines natürlichen Promotors stehen oder mit regulatorischen Elementen fremder Gene verknüpft sein.

Die Erfindung betrifft ferner transgene Pflanzen, die die oben beschriebenen transgenen Pflanzenzellen enthalten.

Bei der Pflanze, die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen transformiert ist, und in der aufgrund der Einführung eines solchen Moleküls ein Debranching-Enzym aus Kartoffel synthetisiert wird, kann es sich im Prinzip um jede beliebige Pflanze handeln. Vorzugsweise ist es eine monokotyle oder dikotyle Nutzpflanze, insbesondere eine stärke-speichernde Pflanze, wie z.B. Getreidepflanzen, Leguminosen, Kartoffeln oder Maniok.

Unter Getreidepflanzen werden insbesondere monokotyle Pflanzen verstanden, die zur Ordnung Poales, bevorzugt solche, die zur Familie der Poaceae gehören. Beispiele hierfür sind die Pflanzen, die zu den Gattungen *Avena* (Hafer), *Triticum* (Weizen), *Secale* (Roggen), *Hordeum* (Gerste), *Oryza* (Reis), *Panicum*, *Pennisetum*, *Setaria*, *Sorghum* (Hirse), *Zea* (Mais) etc. gehören. Stärkespeichernde Leguminosen sind z.B. manche Arten der Gattung *Pisum* (z.B. *Pisum sativum*), *Vicia* (z.B. *Vicia faba*), *Cicer* (z.B. *Cicer arietinum*), *Lens* (z.B. *Lens culinaris*), *Phaseolus* (z.B. *Phaseolus vulgaris* und *Phaseolus coccineus*), etc.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die aus den transgenen Pflanzenzellen oder Pflanzen erhältliche Stärke. Die Expression einer neuen oder zusätzlichen Debranching-Enzymaktivität aus Kartoffel in den erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen hat einen Einfluß auf den Verzweigungsgrad des in den Zellen und Pflanzen synthetisierten Amylopektins. Daher besitzt eine in diesen Pflanzen synthetisierte Stärke veränderte physikalische und/oder chemische Eigenschaften im Vergleich zu Stärke aus Wildtyp-Pflanzen.

Gegenstand der Erfindung ist ferner Vermehrungsmaterial von erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen, beispielsweise Samen, Früchte, Stecklinge, Knollen, Wurzelstöcke etc., wobei dieses Vermehrungsmaterial oben beschriebene transgene Pflanzenzellen enthält. Im Fall von Kartoffelpflanzen handelt es sich bei dem Vermehrungsmaterial vorzugsweise um die Knollen.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung transgene Pflanzenzellen von Kartoffel, bei denen die Aktivität des erfindungsgemäßen Debranching-Enzyms verringert ist aufgrund der Inhibition der Transkription oder Translation von endogenen Nucleinsäuremolekülen, die ein derartiges neues Debranching-Enzym codieren. Dies wird vorzugsweise dadurch erreicht, daß ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül oder ein Teil davon in den entsprechenden Pflanzenzellen in antisense-Orientierung exprimiert wird und es aufgrund eines antisense-Effektes zur Verringerung der beschriebenen Debranching-Enzymaktivität kommt. Eine weitere Möglichkeit zur Verringerung der Debranching-Enzymaktivität in pflanzlichen Zellen besteht in der Expression von geeigneten Ribozymen, die spezifisch Transkripte der erfindungsgemäßen DNA-Moleküle spalten. Die Herstellung derartiger Ribozyme mit Hilfe der erfindungsgemäßen DNA-Moleküle ist dem Fachmann geläufig. Möglich ist auch die Expression von Molekülen, die sowohl einen antisense- als auch einen Ribozymeffekt in Kombination ausüben. Alternativ kann die Verringerung der Debranching-Enzymaktivität in den Pflanzenzellen auch durch einen Cosuppressionseffekt erfolgen. Das Verfahren zur Verringerung der Aktivität erfindungsgemäßer Enzyme in den Pflanzenzellen durch einen Cosuppressionseffekt ist dem Fachmann bekannt und ist beispielsweise 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 anderen Quellen.

Die Expression von Ribozymen zur Verringerung der Aktivität von bestimmten Enzymen in Zellen ist dem Fachmann ebenfalls bekannt und ist beispielsweise beschrieben in EP-B1 0 321 201. Die Expression von Ribozymen in pflanzlichen Zellen wurde z.B. beschrieben in Feyter et al. (Mol. Gen. Genet. 250 (1996), 329-338).

Andere Möglichkeiten, die Aktivität der beschriebenen neuen Debranching-Enzyme in pflanzlichen Zellen zu reduzieren, sind dem Fachmann bekannt, beispielsweise die Mutagenese genomischer Sequenzen, die derartige Enzyme codieren, z.B. durch "gene tagging" oder Transposon-Mutagenese oder die Expression von Antikörpern, die spezifisch die neuen Debranching-Enzyme erkennen. Die Mutagenese genomischer Sequenzen kann sowohl codierende Bereiche des Gens (Introns oder Exons) betreffen, als auch regulatorische Bereiche, insbesondere die für die Initiation der Transkription erforderlichen.

Die Erfindung betrifft ferner transgene Kartoffelpflanzen, die die oben beschriebenen transgenen Pflanzenzellen mit verringerter Debranching-Enzymaktivität enthalten.

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls die aus den transgenen Zellen oder Pflanzen erhältliche modifizierte Stärke. Die Amylopektinstärke der transgenen Zellen und Pflanzen weist aufgrund der verringerten Debranching-Enzymaktivität einen veränderten Verzweigungsgrad auf im Vergleich zu Stärke aus nichttransformierten Pflanzen.

Die Erfindung betrifft auch Vermehrungsmaterial der vorstehend beschriebenen transgenen Pflanzen, insbesondere Samen und Knollen, wobei diese vorstehend beschriebene transgene Pflanzenzellen enthalten.

Transgene Pflanzenzellen, die aufgrund der Expression einer neuen oder zusätzlichen Debranching-Enzymaktivität eine Amylopektinstärke mit einem veränderten Verzweigungsgrad bilden im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Amylopektinstärke, können beispielsweise durch ein Verfahren hergestellt werden, das folgende Schritte umfaßt:

- (a) Herstellung einer Expressionskassette, die folgende DNA-Sequenzen umfaßt:
 - (i) einen Promotor, der die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleistet;
 - (ii) mindestens eine erfindungsgemäße Nucleinsäuresequenz, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität eines Debranching-Enzyms codiert oder ein biologisch aktives Fragment davon und in *sense*-Orientierung an das 3'-Ende des Promotors gekoppelt ist; und
 - (iii) gegebenenfalls ein Terminationssignal für die Termination der Transkription und die Addition eines poly-A-Schwanzes an das entstehende Transkript, das an das 3'-Ende der codierenden Region gekoppelt ist; und
- (b) Transformation pflanzlicher Zellen mit der in Schritt (a) hergestellten Expressionskassette.

Transgene Pflanzenzellen, die aufgrund der Verringerung der beschriebenen Debranching-Enzymaktivität eine Amylopektinstärke mit einem im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Amylopektinstärke veränderten Verzweigungsgrad bilden, können beispielsweise durch ein Verfahren hergestellt werden, das folgende Schritte umfaßt:

- (a) Herstellung einer Expressionskassette, die folgende DNA-Sequenzen umfaßt:
 - (i) einen Promotor, der die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleistet;

- (ii) mindestens eine erfindungsgemäße Nucleinsäuresequenz, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität eines Debranching-Enzyms codiert oder einen Teil eines solchen Proteins und die in antisense-Orientierung an das 3'-Ende des Promotors gekoppelt ist; und
 - (iii) gegebenenfalls ein Terminationssignal für die Termination der Transkription und die Addition eines poly-A-Schwanzes an das entstehende Transkript, das an das 3'-Ende der codierenden Region gekoppelt ist; und
- (b) Transformation pflanzlicher Zellen mit der in Schritt (a) hergestellten Expressionskassette.

Für den unter (i) genannten Promotor kommt im Prinzip jeder in den für die Transformation gewählten Pflanzen funktionale Promotor in Betracht. Der Promotor kann homolog oder heterolog in bezug auf die verwendete Pflanzenspezies sein. Geeignet ist beispielsweise der 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Odell et al., Nature 313 (1985), 810-812), der eine konstitutive Expression in allen Geweben einer Pflanze gewährleistet und das in der WO/9401571 beschriebene Promotorkonstrukt. Ein anderes Beispiel sind die Promotoren der Polyubiquitingene aus Mais (Christensen et al., Plant Mol. Biol. 18 (1992), 675-689). Es können jedoch auch Promotoren verwendet werden, die nur zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt aktiviert werden (siehe beispielsweise WO/9307279). Von besonderem Interesse können hierbei Promotoren von heat-shock-Proteinen sein, die eine einfache Induktion erlauben. Ferner können die Promotoren verwendet werden, die in einem bestimmten Gewebe der Pflanze zu einer Expression nachgeschalteter Sequenzen führen (siehe z. B. Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2245-2251). Präferentiell werden Promotoren eingesetzt, die in den stärkespeichernden Organen der zu transformierenden Pflanzen aktiv sind. Dies sind z.B. bei Mais die Maiskörner, während es bei der Kartoffel die Knollen sind. Zur Überexpression der er-

findungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in der Kartoffel kann beispielsweise der knollenspezifische B33-Promotor (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) verwendet werden.

Samenspezifische Promotoren sind bereits für verschiedene Pflanzenspezies beschrieben worden. So z.B. der USP-Promotor aus *Vicia faba*, der eine samenspezifische Expression in *V. faba* und anderen Pflanzen gewährleistet (Fiedler et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 669-679; Bäumlein et al., Mol Gen. Genet. 225 (1991), 459-467). In Mais gewährleisten beispielsweise Promotoren der Zein-Gene eine spezifische Expression im Endosperm der Maiskörner (Pedersen et al., Cell 29 (1982), 1015-1026; Quattrocchio et al., Plant Mol. Biol. 15 (1990), 81-93).

In dem Fall, daß die unter Verfahrensschritt (a)(ii) genannte, Nucleinsäuresequenz, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität eines Debranching-Enzyms aus Kartoffel codiert, in *sense*-Orientierung mit dem Promotor verknüpft ist, kann diese Nucleinsäuresequenz sowohl nativen bzw. homologen Ursprungs als auch fremden bzw. heterologen Ursprungs in bezug auf die zu transformierende Pflanzenspezies sein, d.h. es können sowohl Kartoffelpflanzen als auch beliebige andere Pflanzen mit der beschriebenen Expressionskassette transformiert werden, vorzugsweise die obengenannten stärkespeichernden Pflanzen.

Es besteht grundsätzlich die Möglichkeit, daß das synthetisierte Protein in jedem beliebigen Kompartiment der pflanzlichen Zelle lokalisiert sein kann. Pflanzliche Debranching-Enzyme sind in der Regel in den Plastiden lokalisiert und besitzen daher eine Signalsequenz für die Translokation in diese Organellen. Um die Lokalisation in einem anderen Kompartiment der Zelle zu erreichen, muß die DNA-Sequenz, die diese Signalsequenz codiert, entfernt werden und die codierende Region mit DNA-Sequenzen verknüpft werden, die die Lokalisierung in dem jeweiligen Kompartiment gewährleisten. Derartige Sequenzen sind bekannt (Siehe beispielsweise 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).

In dem Fall, daß die unter Verfahrensschritt (a)(ii) genannte Nucleinsäuresequenz aus Kartoffel, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität eines Debranching-Enzyms codiert, in antisense-Orientierung mit dem Promotor verknüpft ist, handelt es sich bei dieser vorzugsweise um eine Nucleinsäuresequenz homologen Ursprungs in bezug auf die zu transformierende Pflanzen. Es können jedoch auch Nucleinsäuresequenzen verwendet werden, die einen hohen Grad an Homologie zu endogen vorhandenen Debranching-Enzym-Genen haben, insbesondere Homologien höher als 80 %, vorzugsweise Homologien zwischen 90 % und 100 % und besonders bevorzugt Homologien über 95 %.

Es können Sequenzen bis zu einer Mindestlänge von 15 bp verwendet werden. Eine inhibierende Wirkung ist aber auch bei der Verwendung kürzerer Sequenzen nicht ausgeschlossen. Bevorzugt werden längere Sequenzen zwischen 100 und 500 Basenpaaren verwendet, für eine effiziente antisense-Inhibition werden insbesondere Sequenzen mit einer Länge über 500 Basenpaaren verwendet. In der Regel werden Sequenzen verwendet, die kürzer als 5000 Basenpaare sind, bevorzugt Sequenzen, die kürzer als 2500 Basenpaare sind.

Terminationssignale für die Transkription in pflanzlichen Zellen sind beschrieben und sind beliebig gegeneinander austauschbar. Verwendet werden kann beispielsweise die Terminationssequenz des Octopinsynthase-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*.

Der Transfer der gemäß Verfahrensschritt (a) konstruierten Expressionskassette in pflanzliche Zellen erfolgt vorzugsweise unter Verwendung von Plasmiden, insbesondere mit Hilfe von Plasmiden, die eine stabile Integration der Expressionskassette in das pflanzliche Genom gewährleisten.

Das oben beschriebene Verfahren zur Überexpression eines neuen Debranching-Enzyms aus Kartoffel kann prinzipiell auf alle Pflanzenspezies angewendet werden. Von Interesse sind

sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen, insbesondere die oben beschriebenen stärkespeichernden Pflanzen. Das oben beschriebene Verfahren zur Reduktion der Debranching-Enzymaktivität wird bevorzugt auf zweikeimblättrige Pflanzen, insbesondere auf Kartoffel angewandt.

Infolge der Einführung einer gemäß den beschriebenen Verfahren konstruierten Expressionskassette kommt es in den transformierten Pflanzenzellen zur Bildung einer RNA. Ist die ein Debranching-Enzym aus Kartoffel codierende Nucleinsäuresequenz in der Expressionskassette in *sense*-Orientierung mit dem Promotor verknüpft, kommt es zur Synthese einer mRNA, die als Matrize für die Synthese eines zusätzlichen oder neuen Debranching-Enzyms aus Kartoffel in den pflanzlichen Zellen dienen kann. Als Folge davon weisen diese Zellen eine Aktivität bzw. eine erhöhte Aktivität des Debranching-Enzyms aus Kartoffel auf, was zu einer Veränderung des Verzweigungsgrades des in den Zellen gebildeten Amylopektins führt. Dadurch wird eine Stärke zugänglich, die sich gegenüber der natürlich vorkommenden Stärke durch eine stärker geordnete Raumstruktur sowie eine gesteigerte Einheitlichkeit auszeichnet. Dies kann unter anderem günstige Auswirkungen auf die Filmbildungseigenschaften haben.

Ist die ein Debranching-Enzym aus Kartoffel codierende Nucleinsäuresequenz dagegen in *antisense*-Orientierung mit dem Promotor verknüpft, so kommt es in transgenen Pflanzenzellen zur Synthese einer *antisense*-RNA, die die Expression von endogenen Debranching-Enzym-Genen inhibiert. Als Folge weisen diese Zellen eine reduzierte Aktivität des neuen Debranching-Enzyms aus Kartoffel auf, was zur Bildung einer modifizierten Stärke führt. Mit Hilfe der *antisense*-Technik ist es möglich Pflanzen herzustellen, bei denen die Expression eines endogenen Debranching-Enzym-Gens in Kartoffel in unterschiedlichem Maße inhibiert ist in einem Bereich von 0 % bis zu 100 %. Dies ermöglicht insbesondere die Herstellung von Kartoffelpflanzen, die Amylopektinstärke mit verschiedensten Variationen im Verzweigungsgrad synthetisieren. Dies

stellt einen Vorteil gegenüber herkömmlichen Züchtungs- und Mutageneseverfahren dar, bei denen die Bereitstellung einer derartigen Vielfalt nur mit erheblichem Zeit- und Kostenaufwand möglich ist. Stark verzweigtes Amylopektin hat eine besonders große Oberfläche und eignet sich dadurch als Copolymer in besonderem Maße. Ein starker Verzweigungsgrad führt außerdem zu einer Verbesserung der Wasserlöslichkeit des Amylopektins. Diese Eigenschaft ist für bestimmte technische Anwendungen sehr vorteilhaft.

Besonders geeignet für die Produktion von verändertem Amylopektin unter Ausnutzung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle die Debranching-Enzyme codieren ist Kartoffel. Die Anwendung der Erfindung ist jedoch nicht auf diese Pflanzenspezies beschränkt. Für die Überexpression kann jede beliebige andere Pflanzenspezies verwendet werden.

Die in den transgenen Pflanzen synthetisierte modifizierte Stärke kann mittels gängiger Methoden aus den Pflanzen oder aus den Pflanzenzellen isoliert und nach der Reinigung zur Herstellung von Nahrungsmitteln und industriellen Produkten verwendet werden.

Die erfindungsgemäßen Stärken können nach dem Fachmann bekannten Verfahren modifiziert werden und eignen sich in unmodifizierter oder modifizierter Form für verschiedene Verwendungen im Nahrungsmittel- oder Nicht-Nahrungsmittelbereich.

Grundsätzlich läßt sich die Einsatzmöglichkeit der Stärke in zwei große Bereiche unterteilen. Der eine Bereich umfaßt die Hydrolyseprodukte der Stärke, hauptsächlich Glucose und Glucanbausteine, die über enzymatische oder chemische Verfahren erhalten werden. Sie dienen als Ausgangsstoff für weitere chemische Modifikationen und Prozesse, wie Fermentation. Für eine Reduktion der Kosten kann hierbei die Einfachheit und kostengünstige Ausführung eines Hydrolyseverfahrens von Bedeutung sein. Gegenwärtig verläuft es im wesentlichen enzymatisch unter Verwendung von Amyloglucosidase. Vorstellbar wäre eine Kosteneinsparung durch einen geringeren Einsatz

von Enzymen. Eine Strukturveränderung der Stärke, z.B. Oberflächenvergrößerung des Korns, leichtere Verdaulichkeit durch geringeren Verzweigungsgrad oder eine sterische Struktur, die die Zugänglichkeit für die eingesetzten Enzyme begrenzt, könnte dies bewirken.

Der andere Bereich, in dem die Stärke wegen ihrer polymeren Struktur als sogenannte native Stärke verwendet wird, gliedert sich in zwei weitere Einsatzgebiete:

1. Nahrungsmittelindustrie

Stärke ist ein klassischer Zusatzstoff für viele Nahrungsmittel, bei denen sie im wesentlichen die Funktion des Bindens von wäßrigen Zusatzstoffen übernimmt bzw. eine Erhöhung der Viskosität oder aber eine erhöhte Gelbildung hervorruft. Wichtige Eigenschaftsmerkmale sind das Fließ- und Sorptionsverhalten, die Quell- und Verkleisterungstemperatur, die Viskosität und Dickungsleistung, die Löslichkeit der Stärke, die Transparenz und Kleisterstruktur, die Hitze-, Scher- und Säurestabilität, die Neigung zur Retrogradation, die Fähigkeit zur Filmbildung, die Gefrier/Taustabilität, die Verdaulichkeit sowie die Fähigkeit zur Komplexbildung mit z.B. anorganischen oder organischen Ionen.

2. Nicht-Nahrungsmittelindustrie

In diesem großen Bereich kann die Stärke als Hilfsstoff für unterschiedliche Herstellungsprozesse bzw. als Zusatzstoff in technischen Produkten eingesetzt. Bei der Verwendung der Stärke als Hilfsstoff ist hier insbesondere die Papier- und Pappeindustrie zu nennen. Die Stärke dient dabei in erster Linie zur Retardation (Zurückhaltung von Feststoffen), der Abbindung von Füllstoff- und Feinstoffteilchen, als Festigungstoff und zur Entwässerung. Darüber hinaus werden die günstigen Eigenschaften der Stärke in bezug auf die Steifigkeit, die Härte, den Klang, den Griff, den Glanz, die Glätte, die Spaltfestigkeit sowie die Oberflächen ausgenutzt.

2.1 Papier- und Pappeindustrie

Innerhalb des Papierherstellungsprozesses sind vier Anwendungsbereiche, nämlich Oberfläche, Strich, Masse und Sprühen, zu unterscheiden.

Die Anforderungen an die Stärke in bezug auf die Oberflächenbehandlung sind im wesentlichen ein hoher Weißegrad, eine angepaßte Viskosität, eine hohe Viskositätsstabilität, eine gute Filmbildung sowie eine geringe Staubbildung. Bei der Verwendung im Strich spielt der Feststoffgehalt, eine angepaßte Viskosität, ein hohes Bindevermögen sowie eine hohe Pigmentaffinität eine wichtige Rolle. Als Zusatz zur Masse ist eine rasche, gleichmäßige, verlustfreie Verteilung, eine hohe mechanische Stabilität und eine vollständige Zurückhaltung im Papierfließ von Bedeutung. Beim Einsatz der Stärke im Sprühbereich sind ebenfalls ein angepaßter Feststoffgehalt, hohe Viskosität sowie ein hohes Bindevermögen von Bedeutung.

2.2 Klebstoffindustrie

Ein großer Einsatzbereich der Stärken besteht in der Klebstoffindustrie, wo man die Einsatzmöglichkeiten in vier Teilbereiche gliedert: die Verwendung als reinem Stärkeleim, die Verwendung bei mit speziellen Chemikalien aufbereiteten Stärkeleimen, die Verwendung von Stärke als Zusatz zu synthetischen Harzen und Polymerdispersionen sowie die Verwendung von Stärken als Streckmittel für synthetische Klebstoffe. 90 % der Klebstoffe auf Stärkebasis werden in den Bereichen Wellpappenherstellung, Herstellung von Papiersäcken, Beuteln und Tüten, Herstellung von Verbundmaterialien für Papier und Aluminium, Herstellung von Kartonagen und Wiederbefeuchtungsleim für Briefumschläge, Briefmarken usw. eingesetzt.

2.3 Textil- und Textilpflegemittelindustrie

Ein großes Einsatzfeld für die Stärken als Hilfsmittel und Zusatzstoff ist der Bereich Herstellung von Textilien und Textilpflegemitteln. Innerhalb der Textilindustrie sind die folgenden vier Einsatzbereiche zu unterscheiden: Der Einsatz der Stärke als Schlichtmittel, d.h. als Hilfsstoff zur Glättung und Stärkung des Klettverhaltens zum Schutz gegen die beim Weben angreifenden Zugkräfte sowie zur Erhöhung der Abriebfestigkeit beim Weben, Stärke als Mittel zur Textilaufrüstung vor allem nach qualitätsverschlechternden Vorbehandlungen, wie Bleichen, Färben usw., Stärke als Verdickungsmittel bei der Herstellung von Farbpasten zur Verhinderung von Farbstoffdiffusionen sowie Stärke als Zusatz zu Kettungsmitteln für Nähgarne.

2.4 Baustoffindustrie

Der vierte Einsatzbereich ist die Verwendung der Stärken als Zusatz bei Baustoffen. Ein Beispiel ist die Herstellung von Gipskartonplatten, bei der die im Gipsbrei vermischte Stärke mit dem Wasser verkleistert, an die Oberfläche der Gipsplatte diffundiert und dort den Karton an die Platte bindet. Weitere Einsatzbereiche sind die Beimischung zu Putz- und Mineralfasern. Bei Transportbeton werden Stärkeprodukte zur Verzögerung der Abbindung eingesetzt.

2.5 Bodenstabilisation

Ein weiterer Markt für die Stärke bietet sich bei der Herstellung von Mitteln zur Bodenstabilisation an, die bei künstlichen Erdbewegungen zum temporären Schutz der Bodenpartikel gegenüber Wasser eingesetzt werden. Kombinationsprodukte aus der Stärke und Polymeremulsionen sind nach heutiger Kenntnis in ihrer Erosions- und verkrustungsmindernden Wirkung den bisher eingesetzten Produkten gleichzusetzen, liegen preislich aber deutlich unter diesen.

2.6 Einsatz bei Pflanzenschutz- und Düngemitteln

Ein Einsatzbereich liegt bei der Verwendung der Stärke in Pflanzenschutzmitteln zur Veränderung der spezifischen Eigenschaften der Präparate. So kann die Stärke zur Verbesserung der Benetzung von Pflanzenschutz- und Düngemitteln, zur dosierten Freigabe der Wirkstoffe, zur Umwandlung flüssiger, flüchtiger und/oder übelriechender Wirkstoffe in mikrokristalline, stabile, formbare Substanzen, zur Mischung inkompatibler Verbindungen und zur Verlängerung der Wirkdauer durch Verminde- rung der Zersetzung eingesetzt werden.

2.7 Pharmaka, Medizin und Kosmetikindustrie

Ein weiteres Einsatzgebiet besteht im Bereich der Pharma- maka, Medizin und Kosmetikindustrie. In der pharmazeu- tischen Industrie kann die Stärke als Bindemittel für Tabletten oder zur Bindemittelverdünnung in Kapseln eingesetzt werden. Weiterhin kann die Stärke als Ta- blettensprengmittel dienen, da sie nach dem Schlucken Flüssigkeit absorbieren und nach kurzer Zeit soweit quellen, daß der Wirkstoff freigesetzt wird. Medizini- sche Gleit- und Wundpuder basieren aus qualitativen Gründen auf Stärke. Im Bereich der Kosmetik werden Stärken beispielsweise als Träger von Puderzusatzstof- fen, wie Düften und Salicylsäure eingesetzt. Ein rela- tiv großer Anwendungsbereich für die Stärke liegt bei Zahnpasta.

2.8 Stärkezusatz zu Kohlen und Briketts

Einen Einsatzbereich bietet die Stärke als Zusatzstoff zu Kohle und Brikett. Kohle kann mit einem Stärkezusatz quantitativ hochwertig agglomeriert bzw. brikettiert werden, wodurch ein frühzeitiges Zerfallen der Briketts verhindert wird. Der Stärkezusatz liegt bei Grillkohle zwischen 4 und 6 %, bei kalorierter Kohle zwischen 0,1 und 0,5 %. Des weiteren gewinnen Stärken als Bindemit-

tel an Bedeutung, da durch ihren Zusatz zu Kohle und Brikett der Ausstoß schädlicher Stoffe deutlich vermindert werden kann.

2.9 Erz- und Kohleschlamm-aufbereitung

Die Stärke kann ferner bei der Erz- und Kohleschlamm-aufbereitung als Flockungsmittel eingesetzt werden.

2.10 Gießereihilfsstoff

Ein weiterer Einsatzbereich besteht als Zusatz zu Gießereihilfsstoffen. Bei verschiedenen Gußverfahren werden Kerne benötigt, die aus Bindemittel-versetzten Sänden hergestellt werden. Als Bindemittel wird heute überwiegend Bentonit eingesetzt, das mit modifizierten Stärken, meist Quellstärken, versetzt ist.

Zweck des Stärkezusatzes ist die Erhöhung der Fließfestigkeit sowie die Verbesserung der Bindefestigkeit. Darüber hinaus können die Quellstärken weitere produktionstechnische Anforderungen, wie im kalten Wasser dispergierbar, rehydratisierbar, gut in Sand mischbar und hohes Wasserbindungsvermögen, aufweisen.

2.11 Einsatz in der Kautschukindustrie

In der Kautschukindustrie kann die Stärke zur Verbesserung der technischen und optischen Qualität eingesetzt werden. Gründe sind dabei die Verbesserung des Oberflächenglanzes, die Verbesserung des Griffs und des Aussehens, dafür wird Stärke vor der Kaltvulkanisation auf die klebrigen gummierten Flächen von Kautschukstoffen gestreut, sowie die Verbesserung der Bedruckbarkeit des Kautschuks.

2.12 Herstellung von Lederersatzstoffen

Eine weitere Absatzmöglichkeit der modifizierten Stärken besteht bei der Herstellung von Lederersatzstoffen.

2.13 Stärke in synthetischen Polymeren

Auf dem Kunststoffsektor zeichnen sich folgende Einsatzgebiete ab: die Einbindung von Stärkefolgeprodukten in den Verarbeitungsprozess (Stärke ist nur Füllstoff, es besteht keine direkte Bindung zwischen synthetischem Polymer und Stärke) oder alternativ die Einbindung von Stärkefolgeprodukten in die Herstellung von Polymeren (Stärke und Polymer gehen eine feste Bindung ein).

Die Verwendung der Stärke als reinem Füllstoff ist verglichen mit den anderen Stoffen wie Talkum nicht wettbewerbsfähig. Anders sieht es aus, wenn die spezifischen Stärkeeigenschaften zum Tragen kommen und hierdurch das Eigenschaftsprofil der Endprodukte deutlich verändert wird. Ein Beispiel hierfür ist die Anwendung von Stärkeprodukten bei der Verarbeitung von Thermoplasten, wie Polyäthylen. Hierbei werden die Stärke und das synthetische Polymer durch Koexpression im Verhältnis von 1 : 1 zu einem 'master batch' kombiniert, aus dem mit granuliertem Polyäthylen unter Anwendung herkömmlicher Verfahrenstechniken diverse Produkte hergestellt werden. Durch die Einbindung von Stärke in Polyäthylenfolien kann eine erhöhte Stoffdurchlässigkeit bei Hohlkörpern, eine verbesserte Wasserdampfdurchlässigkeit, ein verbessertes Antistatikverhalten, ein verbessertes Antiblockverhalten sowie eine verbesserte Bedruckbarkeit mit wäßrigen Farben erreicht werden.

Eine andere Möglichkeit ist die Anwendung der Stärke in Polyurethanschäumen. Mit der Adaption der Stärkederivate sowie durch die verfahrenstechnische Optimierung ist es möglich, die Reaktion zwischen synthetischen Polymeren und den Hydroxygruppen der Stärken gezielt zu steuern. Das Ergebnis sind Polyurethanfolien, die durch die Anwendung von Stärke folgende Eigenschaftsprofile erhalten: eine Verringerung des Wärmeausdehnungskoeffizienten, Verringerung des Schrumpfverhaltens, Verbesserung des Druck/Spannungsverhaltens, Zunahme der Wasserdampfdurchlässigkeit ohne Veränderung der Wasseraufnahme, Verringerung der Entflammbarkeit und der Aufriß-

dichte, kein Abtropfen brennbarer Teile, Halogenfreiheit und verminderte Alterung. Nachteile, die gegenwärtig noch vorhanden sind, sind verringerte Druckfestigkeit sowie eine verringerte Schlagfestigkeit.

Die Produktentwicklung beschränkt sich inzwischen nicht mehr nur auf Folien. Auch feste Kunststoffprodukte, wie Töpfe, Platten und Schalen, sind mit einem Stärkegehalt von über 50 % herzustellen. Des Weiteren sind Stärke/ Polymermischungen günstig zu beurteilen, da sie eine sehr viel höhere biologische Abbaubarkeit aufweisen.

Außerordentliche Bedeutung haben weiterhin auf Grund ihres extremen Wasserbindungsvermögen Stärkepfropfpolymerisate gewonnen. Dies sind Produkte mit einem Rückgrat aus Stärke und einer nach dem Prinzip des Radikalkettenmechanismus aufgepfropften Seitengitters eines synthetischen Monomers. Die heute verfügbaren Stärkepfropfpolymerisate zeichnen sich durch ein besseres Binde- und Rückhaltevermögen von bis zu 1000 g Wasser pro g Stärke bei hoher Viskosität aus. Die Anwendungsbereiche für diese Superabsorber haben sich in den letzten Jahren stark ausgeweitet und liegen im Hygienebereich mit Produkten Windeln und Unterlagen sowie im landwirtschaftlichen Sektor, z.B. bei Saatgutpillierungen.

Entscheidend für den Einsatz der neuen, gentechnisch veränderten Stärken sind zum einen die Struktur, Wassergehalt, Proteingehalt, Lipidgehalt, Fasergehalt, Asche/Phosphatgehalt, Amylose/Amylopektinverhältnis, Molmas-
senverteilung, Verzweigungsgrad, Korngröße und -form sowie Kristallinität, zum anderen auch die Eigenschaften, die in folgende Merkmale münden: Fließ- und Sorptionsverhalten, Verkleisterungstemperatur, Viskosität, Dickungsleistung, Löslichkeit, Kleisterstruktur und -transparenz, Hitze-, Scher- und Säurestabilität, Retrogradationsneigung, Gelbildung, Gefrier/Taustabilität, Komplexbildung, Jodbindung, Filmbildung, Klebekraft, Enzymstabilität, Verdaulichkeit und Reaktivität.

Die Erzeugung modifizierter Stärken mittels gentechnischer Eingriffe in einer transgenen Pflanze kann zum einen die Eigenschaften der aus der Pflanze gewonnenen Stärke dahingehend verändern, daß weitere Modifikationen mittels chemischer oder physikalischer Verfahren nicht mehr notwendig erscheinen. Zum anderen können die durch gentechnische Verfahren veränderte Stärken weiteren chemischen Modifikationen unterworfen werden, was zu weiteren Verbesserungen der Qualität für bestimmte der oben beschriebenen Einsatzgebiete führt. Diese chemischen Modifikationen sind grundsätzlich bekannt. Insbesondere handelt es sich dabei um Modifikationen durch

- Hitzebehandlung,
- Säurebehandlung,
- Oxidation und
- Veresterungen,

welche zur Entstehung von Phosphat-, Nitrat-, Sulfat-, Xanthat-, Acetat- und Citratstärken führen. Weitere organische Säuren können ebenfalls zur Veresterung eingesetzt werden:

- Erzeugung von Stärkeethern
Stärke-Alkylether, O-Allylether, Hydroxylalkylether,
O-Carboxylmethylether, N-haltige Stärkeether, P-haltige
Stärkeether, S-haltige Stärkeether
- Erzeugung von vernetzten Stärken
- Erzeugung von Stärke-Pfropf-Polymerisaten

Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle zur Herstellung von Pflanzen, die eine Amylopektinstärke mit einem veränderten Verzweigungsgrad im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen synthetisieren.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder Teile dieser Moleküle bzw. der reversen Komplemente dieser Moleküle zur Identifizierung und Isolierung homologer Moleküle, die Proteine mit der enzymatischen Aktivität eines Debranching-Enzyms codieren oder Fragmente derartiger Proteine, aus Pflanzen oder anderen Organismen. Für die Definition des Begriffs "Homologie" siehe oben.

Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können prinzipiell ferner auch dazu verwendet werden, Pflanzen herzustellen, bei denen die Aktivität des erfindungsgemäßen Debranching-Enzyms erhöht oder verringert ist und gleichzeitig die Aktivitäten anderer, an der Stärkebiosynthese beteiligter Enzyme verändert sind. Dabei sind alle Kombinationen und Permutationen denkbar. Beispielsweise können Nucleinsäuremoleküle, die ein erfindungsgemäßes Protein codieren oder entsprechende antisense-Konstrukte, in Pflanzenzellen eingebracht werden, bei denen bereits die Synthese endogener Debranching-Enzyme, GBSS I-, SSS I-, II- oder GBSS II-Proteine aufgrund eines antisense-Effektes oder einer Mutation inhibiert ist oder die Synthese des Verzweigungsenzyms inhibiert ist (wie z.B. beschrieben in WO92/14827 oder der ae-Mutante von Mais (Shannon und Garwood, in Whistler, BeMiller und Paschall, Starch: Chemistry and Technology, Academic Press, London, 2nd Edition (1984), 25-86)).

Soll die Inhibierung der Synthese mehrerer Debranching-Enzyme in transformierten Pflanzen erreicht werden, so können DNA-Moleküle zur Transformation verwendet werden, die gleichzeitig mehrere, die entsprechenden Debranching-Enzyme codierenden Regionen in antisense-Orientierung unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors enthalten. Hierbei kann alternativ jede Sequenz unter der Kontrolle eines eigenen Promotors stehen, oder die Sequenzen können als Fusion von einem gemeinsamen Promotor transkribiert werden. Letztere Alternative wird in der Regel vorzuziehen sein, da in diesem

Fall die Synthese der entsprechenden Proteine in etwa gleichem Maße inhibiert werden sollte.

Weiterhin ist die Konstruktion von Molekülen möglich, die neben Debranching-Enzyme codierenden Sequenzen, weitere DNA-Sequenzen enthalten, die andere an der Stärkesynthese oder -modifikation beteiligte Proteine codieren. Diese sind jeweils in antisense-Orientierung an einen geeigneten Promotor gekoppelt. Die Sequenzen können hierbei wiederum hintereinandergeschaltet sein und von einem gemeinsamen Promotor transkribiert werden oder aber von getrennten Promotoren transkribiert werden. Für die Länge der einzelnen codierenden Regionen, die in einem derartigen Konstrukt verwendet werden, gilt das, was oben bereits für die Herstellung von antisense-Konstrukten ausgeführt wurde. Eine obere Grenze für die Anzahl der in einem derartigen DNA-Molekül von einem Promotor aus transkribierten antisense-Fragmente gibt es nicht. Das entstehende Transkript sollte aber in der Regel eine Länge von nicht mehr als 20 kb, vorzugsweise von nicht mehr als 5 kb haben.

Codierende Regionen, die in derartigen DNA-Molekülen in Kombination mit anderen codierenden Regionen in antisense-Orientierung hinter einem geeigneten Promotor lokalisiert sind, können aus DNA-Sequenzen stammen, die für folgende Proteine codieren: Stärkekorngewundene (GBSS I und II) und lösliche Stärkesynthasen (z.B. SSS I und II), Verzweigungsenzyme, andere Debranching-Enzyme, Disproportionierungsenzyme und Stärkephosphorylasen. Dies ist nur eine beispielhafte Aufzählung. Auch die Verwendung anderer DNA-Sequenzen im Rahmen einer derartigen Kombination ist denkbar.

Mit Hilfe derartiger Konstrukte ist es möglich, in Pflanzenzellen, die mit diesen transformiert wurde, die Synthese mehrerer Enzyme gleichzeitig zu inhibieren.

Weiterhin können die Konstrukte in klassische Mutanten eingebracht werden, die für ein oder mehrere Gene der Stärkebiosynthese defekt sind. Diese Defekte können sich z.B. auf folgende Proteine beziehen: Stärkekorngewundene (GBSS I und II) und lösliche Stärkesynthasen (z.B. SSS I und II), Ver-

zweigungsenzyme (BE I und II), Debranching-Enzyme, Disproportionierungsenzyme und Stärkephosphorylasen. Dies ist wiederum nur eine beispielhafte Aufzählung.

Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen stehen eine große Anzahl von Clonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für E.coli und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw.. Die gewünschte Sequenz kann an einer passenden Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird für die Transformation von E.coli-Zellen verwendet. Transformierte E.coli-Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet, anschließend geerntet und lysiert. Das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analyseverfahren zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen Restriktionsanalysen, Gelelektrophoresen und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden eingesetzt. Nach jeder Manipulation kann die Plasmid DNA gespalten und gewonnene DNA-Fragmente mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden. Jede Plasmid-DNA-Sequenz kann in den gleichen oder anderen Plasmiden cloniert werden.

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten.

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

den, sollte vorteilhafterweise ein selektierbares Markergen anwesend sein.

Je nach Einführungsmethode gewünschter Gene in die Pflanzenzelle können gegebenenfalls weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z.B. für die Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so sollte mindestens die rechte Begrenzung, vorteilhafterweise jedoch die rechte und linke Begrenzung der Ti- und Ri-Plasmid T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden.

Werden für die Transformation Agrobakterien verwendet, sollte die einzuführende DNA in spezielle Plasmide cloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären Vektor oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige vir-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf *Agrobacterium tumefaciens* übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in *E.coli* als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen Linker oder Polylinker, welche von der rechten und linken T-DNA Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (Holsters et al. Mol. Gen. Genet. 163 (1978), 181-187). Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium sollte ein Plasmid, das eine vir-Region trägt, enthalten. Die vir-Region ist für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle notwendig. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet.

Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System Offset-drukkerij Kanters B.V., Alblasterdam (1985), Chapter V;

Fraley et al., Crit. Rev. Plant. Sci., 4, 1-46 und An et al. EMBO J. 4 (1985), 277-287 beschrieben worden.

Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes kokultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden. Die so erhaltenen Pflanzen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA untersucht werden. Andere Möglichkeiten der Einführung fremder DNA unter Verwendung des biolistischen Verfahrens oder durch Protoplastentransformation sind bekannt (vgl. z.B. Willmitzer, L., 1993 Transgenic plants. In: Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, eds.), Vol. 2, 627-659, VCH Weinheim-New York-Basel-Cambridge).

Während die Transformation dikotyler Pflanzen über Ti-Plasmid-Vektorsysteme mit Hilfe von Agrobacterium tumefaciens wohl etabliert ist, weisen neuere Arbeiten darauf hin, daß auch monokotyle Pflanzen der Transformation mittels Agrobacterium basierender Vektoren sehr wohl zugänglich sind (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 491-506; Hiei et al., Plant J. 6 (1994), 271-282, Deng et al., Science in China 33 (1990), 28-34; Wilmink et al., Plant Cell Reports 11 (1992), 76-80; May et al., Bio/Technology 13 (1995), 486-492; Conner und Domisse; Int. J. Plant Sci. 153 (1992), 550-555; Ritchie et al., Transgenic Res. 2 (1993), 252-265).

Alternative Systeme zur Transformation von monokotylen Pflanzen sind die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes (Wan und Lemaux, Plant Physiol. 104 (1994), 37-48; Vasil et al., Bio/Technology 11 (1993), 1553-1558; Ritala et al., Plant Mol. Biol. 24 (1994), 317-325; Spencer et al., Theor. Appl. Genet. 79 (1990), 625-631), die Protoplasten-

transformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Einbringung von DNA mittels Glasfasern. Spezifisch die Transformation von Mais wird in der Literatur verschiedentlich beschrieben (vgl. z.B. WO95/06128, EP 0 513 849; EP 0 465 875; Fromm et al., *Biotechnology* 8 (1990), 833-844; Gordon-Kamm et al., *Plant Cell* 2 (1990), 603-618; Koziel et al., *Biotechnology* 11 (1993), 194-200). In EP 292 435 wird ein Verfahren beschrieben, mit Hilfe dessen, ausgehend von einem schleimlosen, weichen (friable) granulösen Mais-Kallus, fertile Pflanzen erhalten werden können. Shillito et al. (*Bio/Technology* 7 (1989), 581) haben in diesem Zusammenhang beobachtet, daß es ferner für die Regenerierbarkeit zu fertilen Pflanzen notwendig ist, von Kallus-Suspensionskulturen auszugehen, aus denen eine sich teilende Protoplastenkultur, mit der Fähigkeit zu Pflanzen zu regenerieren, herstellbar ist. Nach einer in vitro Kultivierungszeit von 7 bis 8 Monaten erhalten Shillito et al. Pflanzen mit lebensfähigen Nachkommen, die jedoch Abnormalitäten in der Morphologie und der Reproduktivität aufweisen. Prioli und Söndahl (*Bio/Technology* 7 (1989), 589) beschreiben die Regeneration und die Gewinnung fertiler Pflanzen aus Mais-Protoplasten der Cateto Mais-Inzuchtlinie Cat 100-1. Die Autoren vermuten, daß die Protoplasten-Regeneration zu fertilen Pflanzen abhängig ist von einer Anzahl verschiedener Faktoren, wie z.B. von Genotyp, vom physiologischen Zustand der Donor-Zellen und von den Kultivierungsbedingungen. Auch die erfolgreiche Transformation anderer Getreidearten wurde bereits beschrieben, z.B. für Gerste (Wan und Lemaux, s.o.; Ritala et al., s.o.) und für Weizen (Nehra et al., *Plant J.* 5 (1994), 285-297).

Ist die eingeführte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen Selektionsmarker, der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid oder einem Antibiotikum wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin u.a. ver-

mittelt. Der individuelle gewählte Marker sollte daher die Selektion transformierter Zellen gegenüber Zellen, denen die eingeführte DNA fehlt, gestatten.

Die transformierten Zellen wachsen innerhalb der Pflanze in der üblichen Weise (siehe auch McCormick et al., Plant Cell Reports 5 (1986), 81-84). Die resultierenden Pflanzen können normal angezogen werden und mit Pflanzen, die die gleiche transformierte Erbanlage oder andere Erbanlagen besitzen, gekreuzt werden. Die daraus entstehenden hybriden Individuen haben die entsprechenden phänotypischen Eigenschaften. Von den Pflanzenzellen können Samen gewonnen werden.

Es sollten zwei oder mehrere Generationen angezogen werden, um sicherzustellen, daß das phänotypische Merkmal stabil beibehalten und vererbt wird. Auch sollten Samen geerntet werden, um sicherzustellen, daß der entsprechende Phänotyp oder andere Eigenarten erhalten geblieben sind.

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

In den Beispielen werden die folgenden Methoden verwendet:

1. Clonierungsverfahren

Zur Clonierung in E.coli wurde der Vektor pBluescript II SK (Stratagene) verwendet.

2. Bakterienstämme

Für den Bluescript-Vektor und für die pUSP-Konstrukte wurde der E.coli-Stamm DH5 α (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburgh, USA) verwendet. Für die in vivo excision wurde der E.coli-Stamm XL1-Blue verwendet.

3. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe eines DNA-Random Primer Labelling Kits der Firma

Boehringer (Deutschland) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Beispiel 1

Clonierung einer cDNA, die ein neues Debranching-Enzym aus *Solanum tuberosum* codiert

Zur Isolierung von cDNA-Molekülen, die ein neues Debranching-Enzym aus *Solanum tuberosum* codieren, wurde eine cDNA-Bibliothek ausgehend von polyA⁺-RNA aus Knollenmaterial in dem Vektor Lambda ZAPII (Stratagene) erstellt und in Phagenköpfe verpackt. *E. coli*-Zellen des Stammes XL1-Blue wurden anschließend mit den die cDNA-Fragmente enthaltenden Phagen infiziert (1×10^6 pfu) und auf Medium in Petrischalen in einer Dichte von ca. 30.000 pro 75 cm² ausplattiert. Nach ca. 8 stündiger Inkubation wurden Nitrozellulosemembranen auf den lysierten Bakterienrasen aufgelegt, die nach einer Minute abgenommen wurden. Die Filter wurden für 2 min in 0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl, dann für 2 min in 0,5 M Tris/HCl pH 7,0 und anschließend für 2 min in 2 x SSC inkubiert. Nach Trocknung und Fixierung der DNA durch UV-Crosslinking wurden die Filter 3 h lang in Hybridisierungspuffer bei 48°C inkubiert, bevor radioaktiv markierte Probe zugesetzt wurde.

Als Probe wurde eine cDNA-Sequenz aus Mais verwendet, die ein Debranching-Enzym codiert (siehe James et al., Plant Cell 7 (1995), 417-429, Nucleotide 1150 - 2128)]

Die Hybridisierung wurde bei 48°C durchgeführt in 2 x SSC, 10 x Dehnhardts-Lösung; 50 mM Na₂HPO₄, pH 7,2; 0,2 % SDS; 5 mM EDTA und 250 µg/ml denaturierte Heringssperma-DNA.

Hybridisierende Phagenclone wurden unter Anwendung von Standardverfahren vereinzelt und weiter gereinigt. Mit Hilfe der in-vivo-excision Methode wurden von positiven Phagenclonen *E. coli*-Clone gewonnen, die ein doppelsträngiges pBluescript-Plasmid mit der jeweiligen cDNA-Insertion enthalten. Nach Überprüfung der Größe und des Restriktionsmusters der Insertion wurde von geeigneten Clonen Plasmid-DNA

isoliert. Ein derart isoliertes Plasmid, Iso5, besaß eine Insertion von 2295 bp.

Beispiel 2

Sequenzanalyse der cDNA-Insertion des Plasmids Iso5

Bei dem entsprechend Beispiel 1 isolierten Plasmids Iso5 wurde die Nucleotidsequenz der cDNA-Insertion durch Standardverfahren mittels der Didesoxymethode (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467) bestimmt. Die Insertion ist 2295 bp lang und die Nucleotidsequenz von 2133 bp dieser Insertion sowie die abgeleitete Aminosäuresequenz ist in Seq ID No. 1 angegeben.

Homologievergleiche ergaben, daß es sich bei dem codierten Protein um ein neues Debranching-Enzym aus Kartoffel handelt.

Die unter Seq ID No. 1 angegebene Nucleotidsequenz repräsentiert eine partielle cDNA, die ein bisher unbekanntes Debranching-Enzym aus Kartoffel codiert. Mit Hilfe dieser Sequenz ist es möglich mittels konventioneller Methoden eine vollständige cDNA-Sequenz oder eine genomische Sequenz aus geeigneten cDNA- oder genomischen Bibliotheken zu isolieren.

38

GGC ATG GTA CCT TCT GCT TCT GAT CAG TTT GAT TGG GAA GGA GAT CTA	94
Gly Met Val Pro Ser Ala Ser Asp Gln Phe Asp Trp Glu Gly Asp Leu	
20 25 30	
TTA CTG AAG TTT CCA CAG AGA GAT CTT GTA ATC TAT GAA ATG CAT GTT	142
Leu Leu Lys Phe Pro Gln Arg Asp Leu Val Ile Tyr Glu Met His Val	
35 40 45	
CGT GGA TTT ACA AAT CAT GAG TCG AGT GAA ACA AAA TAT CCT GGT ACT	190
Arg Gly Phe Thr Asn His Glu Ser Ser Glu Thr Lys Tyr Pro Gly Thr	
50 55 60	
TAC CTT GGT GTT GTG GAG AAA CTT GAT CAC TTG AAG GAA CTT GGT GTC	238
Tyr Leu Gly Val Val Glu Lys Leu Asp His Leu Lys Glu Leu Gly Val	
65 70 75	
AAC TGT ATA GAG CTA ATG CCC TGT CAC GAG TTC AAT GAG CTG GAG TAC	286
Asn Cys Ile Glu Leu Met Pro Cys His Glu Phe Asn Glu Leu Glu Tyr	
80 85 90 95	
TAT AGT TAT AAC TCT GTA TTG GGC GAC TAC AAG TTT AAC TTT TGG GGC	334
Tyr Ser Tyr Asn Ser Val Leu Gly Asp Tyr Lys Phe Asn Phe Trp Gly	
100 105 110	
TAT TCT ACT GTC AAT TTC TTT TCT CCA ATG GGA AGA TAC TCG TCT GCT	382
Tyr Ser Thr Val Asn Phe Phe Ser Pro Met Gly Arg Tyr Ser Ser Ala	
115 120 125	
GGT CTA AGT AAT TGC GGC CTC GGT GCA ATA AAC GAA TTT AAG TAT CTT	430
Gly Leu Ser Asn Cys Gly Leu Gly Ala Ile Asn Glu Phe Lys Tyr Leu	
130 135 140	
GTC AAG GAA GCA CAT AAA CGT GGA ATC GAG GTT ATC ATG GAT GTT GTT	478
Val Lys Glu Ala His Lys Arg Gly Ile Glu Val Ile Met Asp Val Val	
145 150 155	
TTC AAT CAC ACT GCT GAA GGA AAT GAA AAT GGT CCC ATA CTA TCA TTT	526
Phe Asn His Thr Ala Glu Gly Asn Glu Asn Gly Pro Ile Leu Ser Phe	
160 165 170 175	
AGA GGC ATT GAC AAC AGT GTG TTT TAT ACG CTA GCT CCT AAG GGT GAA	574
Arg Gly Ile Asp Asn Ser Val Phe Tyr Thr Leu Ala Pro Lys Gly Glu	
180 185 190	
TTT TAC AAC TAC TCA GGA TGT GGA AAT ACC TTC AAC TGT AAT AAT CCC	622
Phe Tyr Asn Tyr Ser Gly Cys Gly Asn Thr Phe Asn Cys Asn Asn Pro	
195 200 205	
ATT GTA CGT CAA TTT ATA GTG GAT TGC TTG AGA TAT TGG GTT ACC GAA	670
Ile Val Arg Gln Phe Ile Val Asp Cys Leu Arg Tyr Trp Val Thr Glu	
210 215 220	
ATG CAC GTA GAT GGC TTC CGC TTT GAT CTT GCT TCT ATC CTT ACA AGA	718
Met His Val Asp Gly Phe Arg Phe Asp Leu Ala Ser Ile Leu Thr Arg	
225 230 235	

39

AGT AGC AGC TCG TGG AAT GCT GTA AAT GTC TAT GGA AAT TCA ATT GAC	766
Ser Ser Ser Ser Trp Asn Ala Val Asn Val Tyr Gly Asn Ser Ile Asp	
240 245 250 255	
GGT GAC ATG ATC ACC ACA GGC ACT CCT CTC ACA AGC CCA CCA TTG ATT	814
Gly Asp Met Ile Thr Thr Gly Thr Pro Leu Thr Ser Pro Pro Leu Ile	
260 265 270	
GAT ATG ATT AGC AAT GAT CCA ATA CTT AGT GGA GTA AAG CTT ATA GCT	862
Asp Met Ile Ser Asn Asp Pro Ile Leu Ser Gly Val Lys Leu Ile Ala	
275 280 285	
GAA GCA TGG GAT TGT GGA GGC CTT TAC CAA GTT GGC ATG TTT CCG CAC	910
Glu Ala Trp Asp Cys Gly Gly Leu Tyr Gln Val Gly Met Phe Pro His	
290 295 300	
TGG GGT ATC TGG TCG GAG TGG AAC GGA AAG TAC CGT GAC ATG GTA CGT	958
Trp Gly Ile Trp Ser Glu Trp Asn Gly Lys Tyr Arg Asp Met Val Arg	
305 310 315	
CAG TTC ATC AAA GGC ACT GAT GGG TTT TCT GGG GCT TTT GCT GAA TGC	1006
Gln Phe Ile Lys Gly Thr Asp Gly Phe Ser Gly Ala Phe Ala Glu Cys	
320 325 330 335	
CTT TGT GGA AGC CCA AAT CTA TAC CAG AAA GGA GGA AGA AAA CCA TGG	1054
Leu Cys Gly Ser Pro Asn Leu Tyr Gln Lys Gly Gly Arg Lys Pro Trp	
340 345 350	
AAC AGT ATA AAT TTC GTG TGT GCC CAC GAT GGT TTT ACT TTG GCT GAT	1102
Asn Ser Ile Asn Phe Val Cys Ala His Asp Gly Phe Thr Leu Ala Asp	
355 360 365	
TTA GTG ACA TAC AAC AAT AAA CAC AAT TTG GCA AAT GGA GAG GAC AAC	1150
Leu Val Thr Tyr Asn Asn Lys His Asn Leu Ala Asn Gly Glu Asp Asn	
370 375 380	
AAA GAT GGG GAG AAT CAC AAT AAT AGT TGG AAT TGT GGC GAG GAA GGA	1198
Lys Asp Gly Glu Asn His Asn Asn Ser Trp Asn Cys Gly Glu Glu Gly	
385 390 395	
GAA TTT GCA AGT ATC TTT GTG AAG AAA TTG AGG AAA AGA CAA ATG CGG	1246
Glu Phe Ala Ser Ile Phe Val Lys Lys Leu Arg Lys Arg Gln Met Arg	
400 405 410 415	
AAC TTC TTC CTC TGC CTT ATG GTT TCC CAA GGT GTT CCC ATG ATA TAT	1294
Asn Phe Phe Leu Cys Leu Met Val Ser Gln Gly Val Pro Met Ile Tyr	
420 425 430	
ATG GGT GAT GAA TAT GGT CAC ACT AAG GGA GGA AAC AAC AAC ACG TAT	1342
Met Gly Asp Glu Tyr Gly His Thr Lys Gly Gly Asn Asn Asn Thr Tyr	
435 440 445	
TGC CAT GAC AAT TAT ATT AAT TAC TTC CGT TGG GAT AAG AAG GAT GAA	1390
Cys His Asp Asn Tyr Ile Asn Tyr Phe Arg Trp Asp Lys Lys Asp Glu	
450 455 460	

40

TCT TCA TCT GAT TTT TTG AGA TTT TGC GGC CTC ATG ACC AAA TTC CGC	1438
Ser Ser Ser Asp Phe Leu Arg Phe Cys Gly Leu Met Thr Lys Phe Arg	
465 470 475	
CAT GAA TGT GAA TCA CTG GGA TTA GAT GGT TTC CCT ACA GCA GAA AGG	1486
His Glu Cys Glu Ser Leu Gly Leu Asp Gly Phe Pro Thr Ala Glu Arg	
480 485 490 495	
CTG CAA TGG CAT GGT CAC ACT CCT AGA ACT CCA GAT TGG TCT GAA ACA	1534
Leu Gln Trp His Gly His Thr Pro Arg Thr Pro Asp Trp Ser Glu Thr	
500 505 510	
AGT CGA TTC GTT GCA TTT ACA CTG GTC GAC AAA GTG AAG GGA GAA CTA	1582
Ser Arg Phe Val Ala Phe Thr Leu Val Asp Lys Val Lys Gly Glu Leu	
515 520 525	
TAT ATT GCC TTT AAC GCC AGC CAT TTG CCT GTA ACG ATT ACA CTT CCA	1630
Tyr Ile Ala Phe Asn Ala Ser His Leu Pro Val Thr Ile Thr Leu Pro	
530 535 540	
GAA AAG CCT GGT TAT AGA TGG CAG CCG TTT GTG GAC ACA GGC AAA CCA	1678
Glu Lys Pro Gly Tyr Arg Trp Gln Pro Phe Val Asp Thr Gly Lys Pro	
545 550 555	
GCA CCA TTT GAC TTC CTG ACA GAC GAT GTT CCT GAG AGA GAG ACA GCA	1726
Ala Pro Phe Asp Phe Leu Thr Asp Asp Val Pro Glu Arg Glu Thr Ala	
560 565 570 575	
GCC AAA CAA TAT TCT CAT TTT CTG GAC GCG AAC CAG TAT CCG ATG CTC	1774
Ala Lys Gln Tyr Ser His Phe Leu Asp Ala Asn Gln Tyr Pro Met Leu	
580 585 590	
AGT TAT TCA TCC ATT ATT CTT TTA CTA TCA TCT GCT GAT GAT GCG T	1820
Ser Tyr Ser Ser Ile Ile Leu Leu Leu Ser Ser Ala Asp Asp Ala	
595 600 605	
AGTTTCATTC AACAAGCCAG GTGAGGTAA GCAGCTTCAG ATTTGTTAT ATGCAGTGAG	1880
GTGTTACTTT GTAAATAAAG TAAGAAACAG GACAGAACAG AACTGCAAAC AGATAGAACT	1940
GGTGAGGAAG AAGCTGATGA TTTATAAGAT ACACCTTGTA TTATAATTGT ATTTATATAA	2000
AATAAAAAAA AAAAACTAGT GAACTTGTCT GTGCGAAATA AAATGTATAG TTGATTTCAA	2060
AAAAAAAAAA AAAAAAATA AAAAACTCG AGCTCTCTCT CTCTCTCTCT CTCTCTCTCT	2120
CTCTCTCTCT CTC	2133

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 606 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

41

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Asn Ser Ala Arg Gly Pro Glu Asp Asp Cys Trp Pro Pro Met Ala Gly
 1 5 10 15
 Met Val Pro Ser Ala Ser Asp Gln Phe Asp Trp Glu Gly Asp Leu Leu
 20 25 30
 Leu Lys Phe Pro Gln Arg Asp Leu Val Ile Tyr Glu Met His Val Arg
 35 40 45
 Gly Phe Thr Asn His Glu Ser Ser Glu Thr Lys Tyr Pro Gly Thr Tyr
 50 55 60
 Leu Gly Val Val Glu Lys Leu Asp His Leu Lys Glu Leu Gly Val Asn
 65 70 75 80
 Cys Ile Glu Leu Met Pro Cys His Glu Phe Asn Glu Leu Glu Tyr Tyr
 85 90 95
 Ser Tyr Asn Ser Val Leu Gly Asp Tyr Lys Phe Asn Phe Trp Gly Tyr
 100 105 110
 Ser Thr Val Asn Phe Phe Ser Pro Met Gly Arg Tyr Ser Ser Ala Gly
 115 120 125
 Leu Ser Asn Cys Gly Leu Gly Ala Ile Asn Glu Phe Lys Tyr Leu Val
 130 135 140
 Lys Glu Ala His Lys Arg Gly Ile Glu Val Ile Met Asp Val Val Phe
 145 150 155 160
 Asn His Thr Ala Glu Gly Asn Glu Asn Gly Pro Ile Leu Ser Phe Arg
 165 170 175
 Gly Ile Asp Asn Ser Val Phe Tyr Thr Leu Ala Pro Lys Gly Glu Phe
 180 185 190
 Tyr Asn Tyr Ser Gly Cys Gly Asn Thr Phe Asn Cys Asn Asn Pro Ile
 195 200 205
 Val Arg Gln Phe Ile Val Asp Cys Leu Arg Tyr Trp Val Thr Glu Met
 210 215 220
 His Val Asp Gly Phe Arg Phe Asp Leu Ala Ser Ile Leu Thr Arg Ser
 225 230 235 240
 Ser Ser Ser Trp Asn Ala Val Asn Val Tyr Gly Asn Ser Ile Asp Gly
 245 250 255
 Asp Met Ile Thr Thr Gly Thr Pro Leu Thr Ser Pro Pro Leu Ile Asp
 260 265 270
 Met Ile Ser Asn Asp Pro Ile Leu Ser Gly Val Lys Leu Ile Ala Glu
 275 280 285
 Ala Trp Asp Cys Gly Gly Leu Tyr Gln Val Gly Met Phe Pro His Trp
 290 295 300

42

Gly Ile Trp Ser Glu Trp Asn Gly Lys Tyr Arg Asp Met Val Arg Gln
 305 310 315 320
 Phe Ile Lys Gly Thr Asp Gly Phe Ser Gly Ala Phe Ala Glu Cys Leu
 325 330 335
 Cys Gly Ser Pro Asn Leu Tyr Gln Lys Gly Gly Arg Lys Pro Trp Asn
 340 345 350
 Ser Ile Asn Phe Val Cys Ala His Asp Gly Phe Thr Leu Ala Asp Leu
 355 360 365
 Val Thr Tyr Asn Asn Lys His Asn Leu Ala Asn Gly Glu Asp Asn Lys
 370 375 380
 Asp Gly Glu Asn His Asn Asn Ser Trp Asn Cys Gly Glu Glu Gly Glu
 385 390 395 400
 Phe Ala Ser Ile Phe Val Lys Lys Leu Arg Lys Arg Gln Met Arg Asn
 405 410 415
 Phe Phe Leu Cys Leu Met Val Ser Gln Gly Val Pro Met Ile Tyr Met
 420 425 430
 Gly Asp Glu Tyr Gly His Thr Lys Gly Gly Asn Asn Asn Thr Tyr Cys
 435 440 445
 His Asp Asn Tyr Ile Asn Tyr Phe Arg Trp Asp Lys Lys Asp Glu Ser
 450 455 460
 Ser Ser Asp Phe Leu Arg Phe Cys Gly Leu Met Thr Lys Phe Arg His
 465 470 475 480
 Glu Cys Glu Ser Leu Gly Leu Asp Gly Phe Pro Thr Ala Glu Arg Leu
 485 490 495
 Gln Trp His Gly His Thr Pro Arg Thr Pro Asp Trp Ser Glu Thr Ser
 500 505 510
 Arg Phe Val Ala Phe Thr Leu Val Asp Lys Val Lys Gly Glu Leu Tyr
 515 520 525
 Ile Ala Phe Asn Ala Ser His Leu Pro Val Thr Ile Thr Leu Pro Glu
 530 535 540
 Lys Pro Gly Tyr Arg Trp Gln Pro Phe Val Asp Thr Gly Lys Pro Ala
 545 550 555 560
 Pro Phe Asp Phe Leu Thr Asp Asp Val Pro Glu Arg Glu Thr Ala Ala
 565 570 575
 Lys Gln Tyr Ser His Phe Leu Asp Ala Asn Gln Tyr Pro Met Leu Ser
 580 585 590
 Tyr Ser Ser Ile Ile Leu Leu Leu Ser Ser Ala Asp Asp Ala
 595 600 605

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Nucleinsäuremolekül, das ein Protein mit der biologischen Aktivität eines Debranching-Enzyms aus *Solanum tuberosum* codiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
 - (a) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, das die unter SeqID No. 2 angegebene Aminosäuresequenz aufweist;
 - (b) Nucleinsäuremolekülen, die die unter Seq ID No. 1 angegebene Nucleotidsequenz enthalten;
 - (c) Nucleinsäuremolekülen, die mit einem Nucleinsäuremolekül nach (a) oder (b) hybridisieren; und
 - (d) Nucleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Nucleotidsequenz eines Nucleinsäuremoleküls nach (a), (b) oder (c) abweicht.
2. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, das ein cDNA-Molekül ist.
3. Nucleinsäuremolekül von mindestens 15 bp Länge, das spezifisch mit einem Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1 oder 2 hybridisiert.
4. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 3, das spezifisch mit einem Transkript eines Nucleinsäuremoleküls nach Anspruch 1 oder 2 hybridisiert und dadurch dessen Translation verhindert.
5. Vektor enthaltend ein Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1 oder 2.
6. Vektor nach Anspruch 5, wobei das Nucleinsäuremolekül in sense-Orientierung mit regulatorischen Elementen verknüpft ist, die die Transkription und Translation in

- prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen ermöglichen.
7. Wirtszelle, die mit einem Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1 oder 2 oder mit einem Vektor nach Anspruch 5 oder 6 genetisch modifiziert ist.
 8. Verfahren zur Herstellung eines Proteins mit der biologischen Aktivität eines Debranching-Enzyms aus *Solanum tuberosum*, bei dem Wirtszellen nach Anspruch 7 unter geeigneten Bedingungen kultiviert werden und das synthetisierte Protein aus der Kultur gewonnen wird.
 9. Protein mit der biologischen Aktivität eines Debranching-Enzyms aus *Solanum tuberosum*, das codiert wird von einem Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1 oder 2.
 10. Wirtszelle nach Anspruch 7, die eine transgene Pflanzenzelle ist und wobei ein Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1 oder 2 stabil, im Genom integriert vorliegt und exprimiert wird.
 11. Transgene Pflanze enthaltend transgene Pflanzenzellen nach Anspruch 10.
 12. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 11, die eine stärkespeichernde Pflanze ist.
 13. Transgene Pflanze nach Anspruch 12, die eine Getreidepflanze ist.
 14. Transgene Pflanze nach Anspruch 12, die eine Kartoffelpflanze ist.
 15. Transgene Pflanzenzelle, die im Vergleich zu nicht-transformierten Zellen eine Verringerung der Aktivität eines Proteins nach Anspruch 9 aufweist und die stabil

- in ihr Genom integriert ein rekombinantes Molekül aufweist bestehend aus
- (a) einem in pflanzlichen Zellen aktiven Promotor; und
 - (b) einer Nucleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
 - (i) Nucleinsäuresequenzen, die mit dem unter (a) genannten Promotor derart verknüpft sind, daß sie bei Transkription zur Synthese einer antisense-RNA zu einem Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1 oder 2 führen;
 - (ii) Nucleinsäuresequenzen, die ein Ribozym codieren, das spezifisch Transkripte von Nucleinsäuremolekülen nach Anspruch 1 oder 2 spaltet; und
 - (iii) Nucleinsäuresequenzen, die mit dem unter (a) genannten Promotor derart verknüpft sind, daß sie bei Transkription zur Synthese einer sense-RNA für ein Protein nach Anspruch 9 führen, deren Expression in pflanzlichen Zellen zu einem Cosuppressionseffekt führt.
16. Transgene Pflanzen enthaltend Pflanzenzellen nach Anspruch 15.
17. Transgene Pflanze nach Anspruch 16, die eine Kartoffelpflanze ist.
18. Vermehrungsmaterial von Pflanzen nach einem der Ansprüche 11 bis 14 oder nach Anspruch 16 oder 17 enthaltend Pflanzenzellen nach Anspruch 10 oder nach Anspruch 15.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/02292

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12N15/56 C12N15/82 C12N9/44 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	THE PLANT CELL, vol. 7, 1995, pages 417-429, XP002033602 JAMES, M.G., ET AL.: "Characterization of the maize gene sugary1, a determinant of starch composition in kernalns" see the whole document ---	1-7,10
X	WO 96 03513 A (MONSANTO CO) 8 February 1996 see the whole document ---	1-18
X	WO 95 04826 A (INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG ;KOSSMANN JENS (DE); EMMERMANN MICHA) 16 February 1995 see the whole document ---	1-18
	-/--	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 August 1997

Date of mailing of the international search report

14.08.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Maddox, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/02292

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 47, no. 4, 1 January 1983, pages 771-779, XP002001115 ISHIZAKI Y ET AL: "DEBRANCHING ENZYMES OF POTATO TUBERS (SOLANUM TUBEROSUM L.) I PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF POTATO ISOMYLASE" see the whole document ---	9
P,X	WO 96 19581 A (INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG ;KOSSMANN JENS (DE); EMMERMANN MICHA) 27 June 1996 see the whole document ---	9
A	WO 92 11382 A (CALGENE INC) 9 July 1992 see the whole document ---	7-18
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 99, no. 9, 29 August 1983 Columbus, Ohio, US; abstract no. 66467, ISHIZAKI, Y., ET AL.: "Debranching enzymes of potato tubers (Solanum tuberosum L.). II. Purification of a pullulanase (R-enzyme) from potato tubers and comparison of its properties with those of the potato isoamylase" XP002036742 see abstract & DENPU KAGAKU, vol. 30, no. 1, 1983, pages 19-29, -----	8,9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/02292

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9603513 A	08-02-96	AU 3143795 A	22-02-96
		CA 2195786 A	08-02-96
		EP 0772683 A	14-05-97
		PL 318354 A	09-06-97

WO 9504826 A	16-02-95	DE 4327165 A	16-02-95
		AU 7535294 A	28-02-95
		EP 0713531 A	29-05-96
		JP 9501052 T	04-02-97
		CA 2169174 A	16-02-95
		HU 73740 A	30-09-96

WO 9619581 A	27-06-96	DE 4447387 A	27-06-96
		AU 4433396 A	10-07-96

WO 9211382 A	09-07-92	US 5349123 A	20-09-94
		CA 2084079 A	22-06-92
		EP 0542929 A	26-05-93

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/02292

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 C12N15/56 C12N15/82 C12N9/44 A01H5/00				
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK				
B. RECHERCHIERTE GEBIETE				
Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 C12N A01H				
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen				
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)				
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN				
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.		
X	THE PLANT CELL, Bd. 7, 1995, Seiten 417-429, XP002033602 JAMES, M.G., ET AL.: "Characterization of the maize gene sugary1, a determinant of starch composition in kernals" siehe das ganze Dokument ---	1-7,10		
X	WO 96 03513 A (MONSANTO CO) 8.Februar 1996 siehe das ganze Dokument ---	1-18		
X	WO 95 04826 A (INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG ;KOSSMANN JENS (DE); EMMERMANN MICHA) 16.Februar 1995 siehe das ganze Dokument ---	1-18		
	-/--			
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"><input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen</td> <td style="width: 50%; border: none;"><input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie</td> </tr> </table>			<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen	<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen	<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie			
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist				
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 1. August 1997		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 14.08.79		
Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Maddox, A		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/02292

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 47, Nr. 4, 1.Januar 1983, Seiten 771-779, XP002001115 ISHIZAKI Y ET AL: "DEBRANCHING ENZYMES OF POTATO TUBERS (SOLANUM TUBEROSUM L.) I PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF POTATO ISOMYLASE" siehe das ganze Dokument ---	9
P,X	WO 96 19581 A (INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG ;KOSSMANN JENS (DE); EMMERMANN MICHA) 27.Juni 1996 siehe das ganze Dokument ---	9
A	WO 92 11382 A (CALGENE INC) 9.Juli 1992 siehe das ganze Dokument ---	7-18
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 99, no. 9, 29.August 1983 Columbus, Ohio, US; abstract no. 66467, ISHIZAKI, Y., ET AL.: "Debranching enzymes of potato tubers (Solanum tuberosum L.). II. Purification of a pullulanase (R-enzyme) from potato tubers and comparison of its properties with those of the potato isoamylase" XP002036742 siehe Zusammenfassung & DENPU KAGAKU, Bd. 30, Nr. 1, 1983, Seiten 19-29, -----	8,9

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/02292

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9603513 A	08-02-96	AU 3143795 A	22-02-96
		CA 2195786 A	08-02-96
		EP 0772683 A	14-05-97
		PL 318354 A	09-06-97

WO 9504826 A	16-02-95	DE 4327165 A	16-02-95
		AU 7535294 A	28-02-95
		EP 0713531 A	29-05-96
		JP 9501052 T	04-02-97
		CA 2169174 A	16-02-95
		HU 73740 A	30-09-96

WO 9619581 A	27-06-96	DE 4447387 A	27-06-96
		AU 4433396 A	10-07-96

WO 9211382 A	09-07-92	US 5349123 A	20-09-94
		CA 2084079 A	22-06-92
		EP 0542929 A	26-05-93
