

Transportproteine für Oxoderivate stickstoffhaltiger Heterozyklen und hierfür codierende Nukleinsäuren

pdfulltext Die Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die die codierende Region für ein Transportprotein für stickstoffhaltige Heterozyklen, insbesondere deren Oxoderivate, enthalten. Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung der Nukleinsäuren sowie Vektoren, mobile Elemente, Wirtszellen und Pflanzen sowie deren Teile und Samen, die solche Nukleinsäuren enthalten. Weiter betrifft die Erfindung auch Verfahren zur Herstellung von Pflanzen, die mit den Nukleinsäuren transformiert sind. Darüber hinaus betrifft die Erfindung auch Transportproteine für stickstoffhaltige Heterozyklen. Transporter spielen für lebende Organismen eine besondere Rolle. Sie entscheiden über die Aufnahme oder Abgabe eines Stoffes in eine oder aus einer Zelle bzw. einem Organismus und steuern darüber hinaus den Transport und die Verteilung der Stoffe zwischen Zellen. Transporter stehen in der Regel am Anfang oder Ende eines Stoffwechselwegs und nehmen daher grundsätzlich übergeordnete Kontrollfunktionen wahr. In höheren Pflanzen sind Transportprozesse zur Verteilung von Assimilaten, Metaboliten und Phytohormonen von hoher Bedeutung. In diesem Zusammenhang sind insbesondere Transportprozesse für stickstoffhaltige Heterozyklen zu erwähnen, da diese Verbindungen im Stoffwechsel der Pflanze in zentraler Rolle mitwirken. So wird bei einigen tropischen Leguminosen, wie z.B. der wirtschaftlich sehr wichtigen Sojabohne, der in den Wurzelknöllchen fixierte Stickstoff in Form von Allantoin und seinem Abbauprodukt Allantoat aus den Wurzelknöllchen in den Sproß transportiert. Auch in Nicht-Leguminosen spielen derartige Transporter aber wahrscheinlich eine wichtige Rolle, beispielsweise während der Seneszenz. In allen Pflanzen liegt z.B. mit den Nukleobasen eine beträchtliche Menge des Gesamtstickstoffs in Form von N-haltigen Heterozyklen vor. Während der Seneszenz kommt es zu einer allgemeinen Mobilisierung der Nährstoffe in den absterbenden Geweben, die dann in entsprechende Speicherorgane oder Früchte transportiert werden. Durch den Abtransport und den Abbau von N-haltigen Heterozyklen kann der in ihnen enthaltene Stickstoff wieder zurückgewonnen werden. Darüber hinaus spielen N-haltige Heterozyklen, insbesondere deren Oxoderivate, auch im Sekundärstoffwechsel der Pflanze, beispielsweise bei der Signalübertragung durch Hormone, eine wichtige Rolle. In diesem Zusammenhang sind z.B. Verbindungen wie Nikotin, Barbitursäure oder Coffein zu nennen. Ferner sind Pestizide, die Derivate von Hydantoin darstellen, eine weitere wichtige Klasse von Oxoderivaten N-haltiger Heterozyklen. Bei Pflanzen ist über die beteiligten Transportproteine trotz ihrer erheblichen Bedeutung bislang wenig bekannt. In DE 19907209, WO 00/49152 sowie in Gillissen et al. (2000), The Plant Cell 12, 291-300, ist eine Familie von Transportproteinen (AtPUP) aus Arabidopsis beschrieben, die beispielsweise Adenin und Cytosin transportieren. Nachteil dieser Transportproteine ist aber, daß sie wichtige Verbindungen wie z.B. Allantoin, Hydantoin, Oxypurinol, Uracil, Urat (Harnsäure oder Salze hiervon) oder Xanthin nicht transportieren können. Dabei wäre es wünschenswert, wenn solche Proteine bzw. hierfür codierende Nukleinsäuren verfügbar wären, um bei Nutzpflanzen gezielt in den Stoffwechsel dieser Verbindungen und von Derivaten dieser Verbindungen eingreifen zu können. Bislang ist man weitgehend auf rein

züchterische Maßnahmen angewiesen, um beispielsweise bei Sojabohnen eine Verbesserung des Öl/Protein-Verhältnisses zu erzielen. Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, Nukleinsäuren zur Verfügung zu stellen, die eine gezielte Kontrolle des Im- und Exports von N-haltigen Heterozyklen, die von den bekannten Transportern nicht transportiert werden, bei Pflanzen ermöglichen. Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch eine Nukleinsäure, die die codierende Region für ein Transportprotein für stickstoffhaltige Heterozyklen, insbesondere deren Oxoderivate, enthält, wobei die Nukleinsäure für ein Transportprotein codiert, das eine oder mehrere Verbindungen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einem Oxoderivat mit mindestens zwei Oxo-Gruppen im Ringsystem des Heterozyklus, ausgenommen Koffein, und einem Oxoderivat mit mindestens drei Oxo-Gruppen im Ringsystem des Heterozyklus, transportiert. Bevorzugte Oxoderivate mit mindestens zwei Oxo-Gruppen (-CO-) im Ringsystem sind Hydantoin, Oxypurinol, Uracil und Xanthin. Bevorzugte Oxoderivate mit mindestens drei Oxo-Gruppen im Ringsystem sind Allantoin und Urat. Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine Nukleinsäure, die die codierende Region für ein Transportprotein für stickstoffhaltige Heterozyklen, insbesondere deren Oxoderivate, enthält, wobei die Nukleinsäure a) eine DNA-Sequenz, die für ein Peptid gemäß einer der Sequenzen der SEQ ID NO: 15 bis SEQ ID NO: 22 codiert, oder b) eine zu der DNA-Sequenz gemäß a) komplementäre Nukleotidsequenz, oder c) eine der DNA-Sequenz gemäß a) entsprechende RNA-Sequenz oder DNA/RNA-Mischsequenz umfaßt, oder d) mit einer Nukleinsäure, die die DNA-Sequenz gemäß a) oder eine zu der DNA-Sequenz gemäß a) komplementäre Nukleotidsequenz aufweist, hybridisiert. Die genannten Sequenzen der SEQ ID NO: 15 bis SEQ ID NO: 22 sind Varianten der folgenden Consensus-Sequenz, die eine potentielle ATP-Bindungsstelle enthält und Transportproteinen der hier erstmals beschriebenen UPS-Familie gemeinsam ist: Die Angabe von Aminosäuren in eckigen Klammern bedeutet hierbei, daß sowohl die eine als auch die andere der in der Klammer angegebenen Aminosäure an dieser Stelle in der Sequenz vorkommen kann. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren codieren für Transportproteine, die in verschiedenen Geweben vorkommen und sowohl den Im- als auch den Export von N-haltigen Heterozyklen, insbesondere von deren Oxoderivaten, kontrollieren. Der hier verwendete Begriff "N-haltige Heterozyklen" umfaßt Nukleobasen und ihre Derivate sowie mit Nukleobasen chemisch verwandte Stoffe. Hierzu zählen beispielsweise die Purinbasen Adenin und Guanin sowie Derivate wie Xanthin, Hypoxanthin, Allantoin, Urat (Harnsäure und deren Salze), Xanthosin oder Inosin. Auch Cytokinine, wie z.B. Zeatin, Isopentenyladenin oder Kinetin und bestimmte Alkaloide, wie z.B. Coffein, Theophyllin, Theobromin oder Nikotin werden von diesem Begriff umfaßt. Zu den N-haltigen Heterozyklen zählen aber auch die Pyrimidinbasen Cytosin, Thymin und Uracil und Derivate wie beispielsweise Barbiturate. Auch Folsäure, Oxypurinol und Allopurinol werden von dem Begriff umfaßt. Weiterhin können die Nukleobasen auch modifiziert und beispielsweise an Zucker oder andere Bausteine gekoppelt sein. Somit umfaßt der Begriff auch Riboside wie z.B. Adenosin oder Cytidin, aber auch Cytokiniriboside. Der hier verwendete Begriff "Oxoderivate von N-haltigen Heterozyklen" bedeutet, daß wenigstens eine Oxo-Gruppe (-CO-) im Ringsystem des Heterozyklus vorkommt. Danach sind beispielsweise Allantoin, Allopurinol, Barbiturate, Cytosin, Guanin, Folsäure, Hydantoin, Inosin, Oxypurinol, Paraxanthin, Theobromin, Theophyllin, Thymin, Uracil, Urat, Xanthin und Xanthosin Oxoderivate von N-haltigen Heterozyklen. Die erfindungsgemäßen

Nukleinsäuren codieren für Proteine (im folgenden auch kurz als "N-Heterozyklentransporter" bezeichnet), die an dem Transport von N-haltigen Heterozyklen, also beispielsweise einer der vorgenannten Verbindungen, durch eine Biomembran beteiligt sind. Dieser Transport kann aktiv oder passiv erfolgen. Zum Nachweis der Transporteraktivität kann beispielsweise die von Ninnemann et al. (1994, EMBO J. 15, 3464-3471) beschriebene Methode angewendet werden. Die Transportproteine weisen keinerlei Verwandtschaft zu dem für Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) bekannten Allantoin-Transporter DAL4 auf und sind auch nicht mit der PUP-Familie (Gillissen et al., 2000, The Plant Cell 12, 291-300) verwandt. Die Nukleotidsequenzen der Nukleinsäuren gemäß der vorliegenden Erfindung können DNA- oder RNA-Sequenzen, aber auch Mischsequenzen aus DNA- und RNA-Nukleotiden sein. Der Begriff "eine der DNA-Sequenz entsprechende RNA-Sequenz" bezeichnet hierbei eine RNA-Sequenz, die die gleiche Abfolge der Purin- und Pyrimidinbasen wie eine DNA-Sequenz, anstelle der Base Thymin in der DNA-Sequenz aber die Base Uracil aufweist. Unter einer DNA/RNA-Mischsequenz wird hier eine Nukleotidsequenz verstanden, die sowohl DNA-Nukleotide als auch RNA-Nukleotide enthält. Chimäre Oligonukleotide stellen beispielsweise solche Mischsequenzen dar. Der hier verwendete Begriff "Hybridisieren" bedeutet Hybridisieren unter üblichen Bedingungen, wie sie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2. Aufl., 1989) beschrieben sind, bevorzugt unter stringenten Bedingungen. Stringente Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise: Hybridisieren in 4 x SSC bei 65 °C und anschließendes mehrfaches Waschen in 0,1 x SSC bei 65 °C für insgesamt etwa 1 Stunde. Wenig stringente Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise: Hybridisieren in 4 x SSC bei 37 °C und anschließendes mehrfaches Waschen in 1 x SSC bei Raumtemperatur. Der hier verwendete Begriff "stringente Hybridisierungsbedingungen" kann auch bedeuten: Hybridisieren bei 68 °C in 0,25 M Natriumphosphat, pH 7,2, 7 % SDS, 1 mM EDTA und 1 % BSA für 16 Stunden und anschließendes zweimaliges Waschen mit 2 x SSC und 0,1 % SDS bei 68 °C. Bevorzugt umfaßt die erfindungsgemäße Nukleinsäure a) eine DNA-Sequenz der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 7, oder b) eine zu der DNA-Sequenz der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 7 komplementäre Nukleotidsequenz, oder c) eine der DNA-Sequenz der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 7 entsprechende RNA-Sequenz oder DNA/RNA-Mischsequenz, oder d) hybridisiert mit einer Nukleinsäure, die die DNA-Sequenz der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 7 oder eine zu der DNA-Sequenz der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 7 komplementäre Nukleotidsequenz aufweist. Die Erfindung betrifft auch Nukleinsäurekonstrukte, Vektoren oder mobile genetische Elemente, die mindestens eine Nukleinsäure gemäß der vorliegenden Erfindung enthalten. Nukleinsäurekonstrukte gemäß der Erfindung sind aus mehreren Nukleinsäuren zusammengesetzt und enthalten neben einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure beispielsweise auch ein regulierendes Element, das die Expression der Nukleinsäure in einer Zelle kontrolliert. Beispiele für solche regulierenden Elemente sind konstitutive oder induzierbare Promotoren, wie z.B. der virale CaMV35S-Promotor (Pietrzak et al., 1986, Nucl. Acids Res. 14, 5857-5868). Das

Konstrukt kann auch in einem Vektor oder mobilen genetischen Element vorliegen. Vektoren oder mobile genetische Elemente, die zur Einführung von Nukleinsäuren in Wirtszellen geeignet sind, beispielsweise Viren, Bakteriophagen, Cosmide, Plasmide, künstliche Hefechromosomen, T-DNA, Transposons, Insertionssequenzen usw., sind dem Fachmann auf dem Gebiet molekularer Klonierungstechniken wohlbekannt. Bevorzugt ist die erfindungsgemäße Nukleinsäure in dem Konstrukt, dem Vektor oder mobilen genetischen Element in Antisense-Orientierung enthalten. "Antisense-Orientierung" einer Nukleinsäure bedeutet in Bezug auf DNA, daß eine Transkription der Nukleinsäure in einer mRNA resultiert, deren Nukleotidsequenz komplementär ist zu der natürlichen (endogenen) mRNA, so daß deren Translation behindert oder verhindert wird. "Antisense-Orientierung" einer RNA bedeutet, daß die RNA-Sequenz zu einer endogenen mRNA komplementär ist und deren Translation durch Anlagerung behindert oder verhindert. Wird eine erfindungsgemäße Nukleinsäure in Antisense-Orientierung beispielsweise mit Hilfe eines Vektors in das Genom einer Pflanzenzelle eingeführt, kann dies zur Unterdrückung der Bildung der pflanzeigenen N-Heterozyklentransporter-Moleküle führen. Hierbei ist die Translation der mRNA des endogenen N-Heterozyklentransporters durch Anlagerung einer Antisense-RNA an die mRNA behindert. Im Falle der Einführung einer DNA-Sequenz wird die Antisense-RNA durch Transkription der DNA-Sequenz gebildet. Im Falle einer der DNA-Sequenz entsprechenden RNA-Sequenz kann diese selbst die Antisense-RNA darstellen. Eine posttranskriptionelle Stummschaltung (PTGS = posttranscriptional gene silencing) des endogenen N-Heterozyklentransportergens kann auch durch Co-Suppression oder RNA-Interferenz herbeigeführt werden, indem die DNA-Sequenz oder eine der DNA-Sequenz entsprechende RNA-Sequenz in Sense-Orientierung in die Pflanzenzelle eingeführt wird, wobei die RNA im Falle der RNA-Interferenz als Doppelstrang-RNA verwendet wird. Darüber hinaus ist es auch möglich, aus RNA- und DNA-Sequenzen zusammengesetzte Nukleinsäuren, chimäre Oligonukleotide, wie sie beispielsweise von Rice et al., 2000, Plant Physiology 123, 427-437, beschrieben werden, einzusetzen, um ein Stummschalten des endogenen N-Heterozyklentransportergens zu bewirken. Die betroffenen Zellen sind weitgehend daran gehindert, N-Heterozyklentransporter zu bilden. Durch eine Kopplung an geeignete gewebespezifische Promotoren ist es auch möglich, gezielt die Bildung von N-Heterozyklentransportern in bestimmten Geweben oder Organen der Pflanze, etwa in den Blättern, zu vermindern oder zu unterdrücken. Ferner betrifft die Erfindung eukaryotische oder prokaryotische Wirtszellen, die mindestens eine Nukleinsäure gemäß der vorliegenden Erfindung enthalten. Bevorzugt ist die Nukleinsäure hierbei in Antisense-Orientierung in der Wirtszelle enthalten. Sie kann aber auch in Sense-Orientierung in einem RNA-Doppelstrang oder einem chimären Oligonukleotid in der Wirtszelle enthalten sein. Dies ermöglicht ebenfalls die Stummschaltung des endogenen N-Heterozyklentransportergens. Die Nukleinsäure können beispielsweise durch Transformation, Mikroinjektion, Protoplastenfusion, Elektroporation, Virusinfektion oder andere Techniken, die dem Fachmann bekannt sind, in Pflanzenzellen eingebracht werden. Die Erfindung betrifft auch Pflanzen sowie Teile oder Samen von Pflanzen, die mit mindestens einer Nukleinsäure gemäß der vorliegenden Erfindung transformiert sind. Die Pflanzen können Leguminosen, beispielsweise Sojapflanzen, Erbsen, Bohnen oder Erdnüsse sein. Es kommen aber auch zahlreiche andere Pflanzen in Frage, beispielsweise Kartoffeln, Tomaten, Baumwolle, Zuckerrüben, Zuckerrohr, Tabak, Kaffee, Raps, Ricinus, Reis- oder

Maispflanzen usw. Bevorzugt sind die transgenen Pflanzen, deren Teile oder deren Samen mit der Nukleinsäure in Antisense-Orientierung transformiert. Hierdurch sind beispielsweise Pflanzen erhältlich, bei denen die Expression eines N-Heterozyklentransportergens unterdrückt ist. Die Erfindung betrifft auch Transportproteine für stickstoffhaltige Heterozyklen, insbesondere deren Oxoderivate, die eine oder mehrere Verbindungen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einem Oxoderivat mit mindestens zwei Oxo-Gruppen im Ringsystem des Heterozyklus, ausgenommen Koffein, und einem Oxoderivat mit mindestens drei Oxo-Gruppen im Ringsystem des Heterozyklus, transportieren. Bevorzugt handelt es sich bei dem Oxoderivat mit mindestens zwei Oxo-Gruppen im Ringsystem um Hydantoin, Oxypurinol, Uracil und Xanthin. Bevorzugte Oxoderivate mit mindestens drei Oxo-Gruppen im Ringsystem sind Allantoin und Urat. Die Erfindung betrifft darüber hinaus Transportproteine für stickstoffhaltige Heterozyklen, insbesondere deren Oxoderivate, deren Aminosäuresequenz a) die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 oder SEQ ID NO: 22, oder b) eine zu der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 oder SEQ ID NO: 22 homologe Aminosäuresequenz umfaßt. Die genannten Aminosäuresequenzen bilden die bereits oben beschriebene Consensus-Sequenz. Bevorzugt umfaßt die Aminosäuresequenz der erfindungsgemäßen Transportproteine die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 oder SEQ ID NO: 14 oder ist zu der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 oder SEQ ID NO: 14 homolog. Die Transportproteine transportieren N-haltige Heterozyklen und gehören zu einer völlig neuartigen Klasse von Transportproteinen, die keinerlei Verwandtschaft zu dem aus Hefe bekannten Allantoin-Transporter DAL4 oder der PUP-Familie aus Arabidopsis aufweisen. Sie unterscheiden sich sowohl strukturell als auch im Substratspektrum deutlich von den bekannten Transportproteinen. "Homolog" bedeutet hier, daß ein Polypeptid oder Protein eine signifikante Ähnlichkeit mit einer Vergleichssequenz aufweist. Homologe Sequenzen sind beispielsweise solche, die unter Zuhilfenahme des Similaritätsalgorithmus BLAST (Altschul et al., 1990, Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol. 215, 403-410) eine signifikante Ähnlichkeit mit Vergleichssequenzen aufweisen. Als signifikant ähnlich werden hier Sequenzen verstanden, die beim Vergleich mit Vergleichssequenzen beispielsweise unter Verwendung des BLAST-Programms des National Centre for Biotechnology Information (NCBI) mit Standardparametern ein Signifikanzniveau p von $< 10^{-5}$ aufweisen. Als homolog gelten des weiteren Sequenzen, die mit Vergleichssequenzen zu mindestens 70 %, bevorzugt zu 85 %, besonders bevorzugt zu über 95 % identisch sind. Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanze, umfassend die Schritte Einführen mindestens einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure in eine Pflanzenzelle und Regenerieren einer Pflanze aus dieser Pflanzenzelle. Bevorzugt wird hierbei die Nukleinsäure in Antisense-Orientierung verwendet. Mit Hilfe des Verfahrens sind Pflanzen erhältlich, die bezüglich des Im- und Exports sowie des Stoffwechsels von N-haltigen Heterozyklen gut kontrollierbar sind. Beispielsweise können nach dem erfindungsgemäßen Verfahren Pflanzen mit verstärkter Expression endogener Transporter N-haltiger Heterozyklen hergestellt werden. Insbesondere kann der Transport von Allantoin z.B. in

Leguminosen und damit möglicherweise auch die Fixierungsrate von atmosphärischem Stickstoff beeinflusst werden. Diese Pflanzen können eine verbesserte N-Mobilisierung aufweisen. Es können aber auch Pflanzen hergestellt werden, deren endogene N-Heterozyklentransporter nicht, nur in geringem Maße oder nur in bestimmten Geweben exprimiert werden. So könnte beispielsweise bei der Sojabohne gezielt in das Öl/Protein-Verhältnis eingegriffen werden. Abhängig vom Verwendungszweck kann sowohl eine Verringerung als auch eine Steigerung des Protein-Gehaltes ein wesentliches Zuchtziel sein. Darüber hinaus kann das erfindungsgemäße Verfahren aber auch eingesetzt werden, um die N-Heterozyklentransportereigenschaften einer Pflanze so zu beeinflussen, daß es zu einer Veränderung der Spezifität des Transportsystems kommt, so daß der Transport neuer Verbindungen ermöglicht wird. Beispielsweise sind auch Veränderungen möglich, die die Affinität oder Substratspezifität des Transporters dahingehend verändern, daß es zu einem effizienteren Transport von N-haltigen Heterozyklen aus seneszenten Blättern kommt. Dies betrifft z.B. Alkaloide, die bisher von den Transportern nicht erkannt werden, synthetische Hormone, die schlecht transportiert werden und N-haltige Heterozyklen, die nicht effizient genug transportiert werden. Außerdem kann die Verteilung von Pestiziden, die auf der chemischen Strukturgrundlage des Hydantoinringes aufgebaut sind (Marton et al., 1993, J. Agr. Food Chem. 41, 148-152; Sakai et al., 1993, J. Pest. Sci., 18, 217-223) dadurch beeinflusst werden. Auch der Einsatz neuer Pestizide bei Pflanzen mit veränderten N-Heterozyklentransportern wird hierdurch ermöglicht. Die Erfindung betrifft auch die Verwendung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure zur Herstellung einer transgenen Pflanzenzelle oder Pflanze mit einer gegenüber dem Wildtyp erhöhten Expression der codierenden Region des Transportproteins für stickstoffhaltige Heterozyklen. Hierdurch sind Pflanzen erhältlich, die beispielsweise bestimmte Alkaloide stärker als Wildtyppflanzen anreichern. Darüber hinaus betrifft die Erfindung die Verwendung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure in Antisense-Orientierung zur Herstellung einer transgenen Pflanzenzelle oder Pflanze mit einer gegenüber dem Wildtyp verminderten Expression der codierenden Region des Transportproteins für stickstoffhaltige Heterozyklen. Die Erfindung wird im weiteren anhand der Figuren 1 bis 5 näher beschrieben. Es zeigt: Figur 1(A) ein Schema zur Komplementation der *dal4/dal5*-Doppelmutante (Hefe) mit *AtUPS1* sowie (B) Wachstum von komplementierten *dal4/dal5*-Doppelmutanten (*dal4/dal5 UPS1*) im Vergleich zu nicht-komplementierten Doppelmutanten (*dal4/dal5*) auf Medium mit Allantoin als alleiniger Stickstoffquelle. Figur 2 einen Vergleich der Allantoinaufnahme des mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure transformierten Hefestamms GEM42::pFL61-UPS1 und des ohne die erfindungsgemäße Nukleinsäure transformierten Stamms GEM42::pFL61. Die Substratkonzentration (14C-Allantoin) betrug 200 mM. Figur 3 eine Analyse der Substratspezifität des in Hefe exprimierten UPS1-N-Heterozyklentransporters. Angegeben ist die relative Aufnahme (100%) von 14C-markiertem Allantoin in Anwesenheit von unmarkiertem Adenin, Allantoin, Allopurinol, Cytidin, Cytosin, Guanin, Harnsäure, Hydantoin, Hypoxanthin, Imidazol, Inosin, Koffein, Oxypurinol, Paraxanthin, Pyrimidin, Theobromin, Theophyllin, Uracil, Uridin, Xanthin und Xanthosin. Die Konzentration von 14C-Allantoin betrug 0.2 mM, die der anderen Substanzen 2 mM. Werte < 100% weisen auf Verdrängung des Substrats 14C-Allantoin am Transportermolekül durch die jeweils andere Verbindung hin. Figur 4 Wachstum von mit UPS5b oder UPS1 komplementierten *dal4/dal5*-Doppelmutanten im Vergleich zu nichtkomplementierten

Doppelmutanten (Vector) auf Medium mit Allantoin als alleiniger Stickstoffquelle. Figur 5 zeigt eine schematische Darstellung der angenommenen Struktur von UPS1. Die Klonierung von N-Heterozyklentransportern erfolgte durch Komplementation von Hefemutanten. Mit Komplementation bezeichnet man eine sich im Phänotyp widerspiegelnde Kompensation eines genetischen Funktionsdefektes unter Beibehaltung der dem Defekt zugrundeliegenden Mutation(en). Komplementation liegt beispielsweise dann vor, wenn ein genetischer Defekt in einem Gen dazu führt, daß die Aufnahme einer für das Wachstum notwendigen Medienkomponente nicht mehr möglich ist und durch die Anwesenheit eines intakten Gens, das die Funktion des defekten Gens übernimmt, dieser Defekt aufgehoben wird, so daß nunmehr ein Wachstum wieder erfolgen kann. Zur Komplementation wurden in dem uraciluxotrophen Hefestamm S23344c (*Saccharomyces cerevisiae*) zunächst die Gene DAL4 und DAL5 durch homologe Rekombination ausgeschaltet (s. Fig. 1A). Diese *dal4/dal5/ura3*-Mutante, die im folgenden als *dal4/dal5*-Doppelmutante oder als GEM42 bezeichnet wird, ist nicht in der Lage, auf Medien, die Allantoin als einzige Stickstoffquelle enthalten, zu wachsen. GEM42 wurde mit cDNA aus jungen Keimlingen von *Arabidopsis thaliana* unter Verwendung des Hefe-Expressionsvektors pFL61 (Minet & Lacroute, 1990, Curr. Genet. 18, 287-291) nach der Methode von Dohmen et al., 1991, Yeast 7, 691-692, transformiert. Etwa 1 µg des Vektors mit einer cDNA-Insertion wurde hierfür verwendet. Hefetransformanten, die auf Minimalmedium mit 0.15% Allantoin als einziger Stickstoffquelle wachsen konnten, wurden vermehrt. Aus diesen Zellen wurde Plasmid-DNA nach Standardverfahren isoliert. Der Stamm GEM42 wurde erneut mit dem isolierten Plasmid transformiert. Auf diese Weise wurde ein Plasmid pFL61-UPS1 erhalten, das die *dal4/dal5*-Doppelmutation komplementieren konnte (s. Fig. 1B). Dieses Plasmid weist eine Insertion mit einer Größe von 1.2 kb auf, die das UPS1-N-Heterozyklentransporter-Gen (SEQ ID NO: 1) enthält. Die Nukleinsäure gemäß SEQ ID NO: 1 codiert für ein Protein gemäß SEQ ID NO: 8. Für den entsprechenden N-Heterozyklentransporter wird im folgenden die Kurzbezeichnung UPS1 verwendet. Auch die Gene gemäß SEQ ID NO 2 bis SEQ ID NO 7 verleihen der *dal4/dal5*-Mutante in diesem System die Eigenschaft, auf Allantoin als einziger N-Quelle wachsen zu können. In Fig. 4 ist dies für UPS5 (SEQ ID NO: 6 und 7) und PvUPS (SEQ ID NO: 5) dargestellt. Der durch Transformation von GEM42 mit dem Plasmid pFL61-UPS1 erhaltene Hefestamm GEM42::pFL61-UPS1 wurde für Untersuchungen zur Aufnahme von Allantoin oder anderen N-haltigen Heterozyklen verwendet. Das N-Heterozyklentransporter-Gen stand dabei unter der Kontrolle des Promotors der Phosphoglyceratkinase aus Hefe. Das von dem Hefestamm GEM42::pFL61-UPS1 exprimierte UPS1-Protein wurde einer Hydrophobizitätsanalyse nach Kyte und Doolittle unterzogen. Das UPS1-Protein weist zehn stark hydrophobe Regionen auf, die lang genug sind, um jeweils einmal die Membran zu durchspannen (Fig. 5). Dies zeigt, daß UPS1 ein Membranprotein ist. Um die Aufnahme von Allantoin durch GEM42::pFL61-UPS1 quantifizieren zu können, wurde ¹⁴C-markiertes Allantoin eingesetzt. Dieses wurde durch enzymatische Modifikation der verwandten Verbindung Harnsäure, die kommerziell als ¹⁴C-Derivat erhältlich ist, hergestellt. Hierzu wurde ¹⁴C-markierte Harnsäure mit hochreiner Uricase (Sigma) enzymatisch umgesetzt. Der Reinheitsgrad des erhaltenen Produkts ¹⁴C-Allantoin wurde mittels HPLC-Untersuchungen ermittelt. Die Aufnahme von ¹⁴C-Allantoin durch Hefezellen des Stamms GEM42, die mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäure gemäß SEQ ID NO: 1, die für UPS1

codiert, transformiert wurden, ist in Fig. 2 dargestellt. Als Kontrolle wurden GEM42-Zellen verwendet, die lediglich mit dem Konstrukt ohne UPS1 transformiert wurden. Für vergleichende Untersuchungen zu den Transportcharakteristiken der Transporterproteine wurden Kompetitionsstudien durchgeführt, wie sie prinzipiell bei Ninnemann et al., 1994, EMBO J. 15, 3464-3471, beschrieben sind. Hierzu wurde die Allantoinaufnahme in Gegenwart eines zehnfachen Überschusses eines anderen N-haltigen Heterozyklus (Adenin, Allopurinol, Cytidin, Cytosin, Guanin, Harnsäure, Hydantoin, Hypoxanthin, Imidazol, Inosin, Koffein, Oxypurinol, Paraxanthin, Pyrimidin, Theobromin, Theophyllin, Uracil, Uridin, Xanthin und Xanthosin) untersucht. Zur Kontrolle wurde auch die Allantoinaufnahme in Gegenwart eines zehnfachen Überschusses von unmarkiertem Allantoin ermittelt. Völlig unerwartet wurde hierbei festgestellt, daß andere N-haltige Heterozyklen, beispielsweise Harnsäure, Hydantoin, Cytosin, Oxypurinol, Uracil und Xanthin, ebenfalls von den Hefezellen aufgenommen wurden (s. Fig. 3). Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Transporter nahmen die Hefezellen also neben Allantoin auch noch zahlreiche andere N-haltige Heterozyklen auf. Arabidopsis-Pflanzen wurden mit einer Nukleinsäure gemäß der vorliegenden Erfindung transformiert. Die Transformation wurde mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* (Stamm C58C1, pGV2260) durchgeführt (Deblaere et al., 1985, Nucl. Acids Res. 13, 4777-4788). Der DNA-Transfer in die Agrobakterien erfolgte durch direkte Transformation nach der Methode von Höfgen und Willmitzer, 1988, Nucl. Acids Res. 16, 9877. Die Plasmid-DNA transformierter Agrobakterien wurde nach der Methode von Birnboim und Doly, 1979, Nucl. Acids Res. 7, 1513-1523, isoliert und nach geeigneter Restriktionsspaltung gelelektrophoretisch analysiert. Die Transformation von *A. thaliana* wurde mittels Vakuum-Infiltration (modifiziert nach Bechtold et al., 1993, Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie III, Sciences de la Vie 316: 1194-1199) ausgeführt. Töpfe (Durchmesser 10 cm) wurden mit Erde gefüllt und anschließend mit einem Fliegennetz überspannt. Auf diesem Netz wurden *A. thaliana*-Samen ausgesät. Sechs bis acht Wochen nach dem Aussäen wurden die Pflanzen für die Vakuum-Infiltration benutzt. Zur Vakuum-Infiltration wurden von den entsprechenden *Agrobacterium*-Stämmen 2 x 1 Liter Kulturen in YEB + Antibiotikum (50 µg/ml Kan und 100 µg/ml Rif) bei 28°C angezogen. Bei einer OD600 von 1,5 wurden die Zellen bei 3000 g geerntet und in 600 ml Infiltrationsmedium (0,5 x MS Medium (Sigma), 5% Saccharose, 44 µM Benzylaminopurin) resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde in 250 ml Weckgläser gefüllt und in einen Exsikkator gestellt. Die *A. thaliana*-Pflanzen wurden "kopfüber" in die Bakteriensuspension getaucht, dann wurde für 5 min Vakuum angelegt. Nach 3-4 Wochen wurden die Samen dieser Pflanzen geerntet. Zur Oberflächensterilisation wurden die Samen 10 min lang in 4% Natriumhypochlorid, 0,02% Triton geschüttelt, bei 1500 g abzentrifugiert, viermal mit sterilem Wasser gewaschen und in 3 ml 0.05% Agarose pro 5000 Samen resuspendiert. Die Samen-Agarose-Lösung wurde auf MSS Medium (1 x MS, 1% Saccharose, 0,8% Agarose, 50 µg/ml Kanamycin, pH 5,8) ausgebreitet (Platten mit 13,5 cm Durchmesser für 5000 Samen). Zur Reduzierung des Feuchtigkeitsverlustes wurden die Platten mit Parafilm verschlossen. Die kanamycinresistenten Pflanzen wurden in Erde umgesetzt. Samen dieser Pflanzen wurden geerntet und analysiert.

简体中文网页