

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
6. Juli 2006 (06.07.2006)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/069710 A1

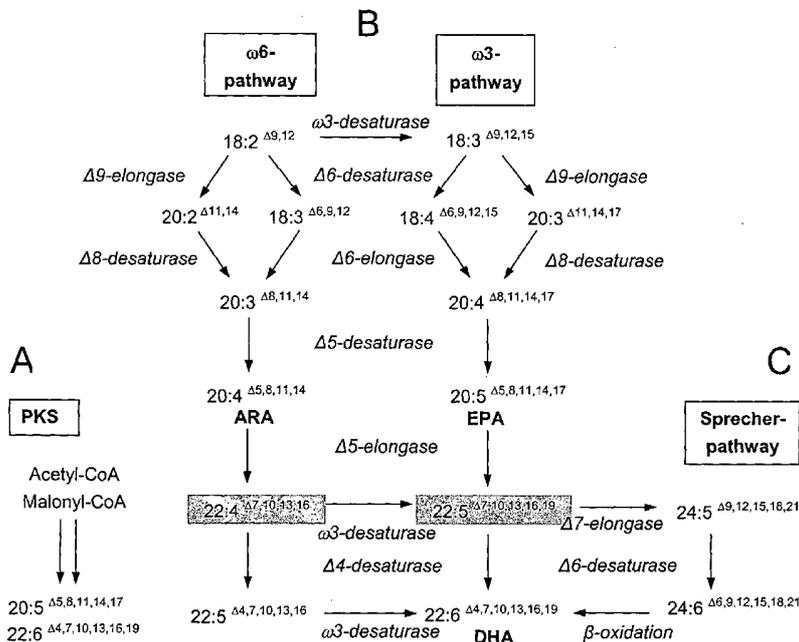
- (51) **Internationale Patentklassifikation:**
C12N 15/82 (2006.01) A01H 5/00 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
- (21) **Internationales Aktenzeichen:** PCT/EP2005/013803
- (22) **Internationales Anmeldedatum:**
21. Dezember 2005 (21.12.2005)
- (25) **Einreichungssprache:** Deutsch
- (26) **Veröffentlichungssprache:** Deutsch
- (30) **Angaben zur Priorität:**
10 2004 063 326.6
23. Dezember 2004 (23.12.2004) DE
- (71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US):** BASF Plant Science GmbH [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).
- (72) **Erfinder; und**
- (75) **Erfinder/Anmelder (nur für US):** CIRPUS, Petra [DE/DE]; Landteilst.12, 68163 Mannheim (DE). BAUER, Jörg [DE/DE]; Thorwaldsenstr. 4a, 67061 Ludwigshafen (DE). HEINZ, Ernst [DE/DE]; Püttkampsweg 13, 22609 Hamburg (DE). DOMERGUE, Frederic [FR/DE]; Ohnhorststr. 18, 22609 Hamburg (DE).
- (74) **Anwalt:** PRESSLER, Uwe; c/o BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title:** METHOD FOR PRODUCING POLYUNSATURATED FATTY ACIDS IN TRANSGENIC ORGANISMS

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG MEHRFACH UNGESÄTTIGTER FETTSÄUREN IN TRANSGENEN ORGANISMEN

AA Verschiedene Synthese-Wege zur Biosynthese von DHA (Docosahexaensäure)



AA ... VARIOUS PATHS OF SYNTHESIS FOR THE BIOSYNTHESIS OF DHA (DOCOSAHEXAENOIC ACID)

inventive method and to the use thereof. The invention finally relates to fatty acids and triglycerides having an increased content in unsaturated fatty acids and to the use thereof.

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in einem Organismus, indem Nukleinsäuren in den Organismus eingebracht werden, die für Polypeptide mit ?-5-Elongase-, ?-6-Desaturase-, eine ?-5-Desaturase-,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2006/069710 A1



(81) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,

TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

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

?-4-Desaturase-, ?-12-Desaturase- und/oder ?-6-Elongaseaktivität codieren. Vorteilhaft stammen diese Desaturasen und Elongasen aus *Ostreococcus*. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Ölen und/oder Triacylglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Die Erfindung betrifft weiterhin die Nukleinsäuresequenzen, Nukleinsäurekonstrukte, Vektoren und Organismen enthaltend die erfindungsgemässen Nukleinsäuresequenzen, Vektoren enthaltend die Nukleinsäuresequenzen und/oder die Nukleinsäurekonstrukte sowie transgene Organismen enthalten die vorgenannten Nukleinsäuresequenzen, Nukleinsäurekonstrukte und/oder Vektoren. Ein weiterer Teil der Erfindung betrifft Öle, Lipide und/oder Fettsäuren hergestellt nach dem erfindungsgemässen Verfahren und deren Verwendung. Ausserdem betrifft die Erfindung ungesättigte Fettsäuren sowie Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren und deren Verwendung.

Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren in transgenen Organismen

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in einem Organismus, indem Nukleinsäuren in den Organismus eingebracht werden, die für Polypeptide mit Δ -5-Elongase-, Δ -6-Desaturase-, eine Δ -5-Desaturase-, Δ -4-Desaturase-, Δ -12-Desaturase- und/oder Δ -6-Elongaseaktivität codieren. Vorteilhaft stammen diese Desaturasen und Elongasen aus *Ostreococcus*. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Ölen und/oder Triacylglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren.

Die Erfindung betrifft weiterhin die Nukleinsäuresequenzen, Nukleinsäurekonstrukte, Vektoren und Organismen enthaltend die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, Vektoren enthaltend die Nukleinsäuresequenzen und/oder die Nukleinsäurekonstrukte sowie transgene Organismen enthalten die vorgenannten Nukleinsäuresequenzen, Nukleinsäurekonstrukte und/oder Vektoren.

Ein weiterer Teil der Erfindung betrifft Öle, Lipide und/oder Fettsäuren hergestellt nach dem erfindungsgemäßen Verfahren und deren Verwendung. Außerdem betrifft die Erfindung ungesättigte Fettsäuren sowie Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren und deren Verwendung.

Fettsäuren und Triacylglyceride haben eine Vielzahl von Anwendungen in der Lebensmittelindustrie, der Tierernährung, der Kosmetik und im Pharmabereich. Je nachdem, ob es sich um freie gesättigte und ungesättigte Fettsäuren oder um Triacylglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren handelt, sind sie für die unterschiedlichsten Anwendungen geeignet. Mehrfachungesättigte Fettsäuren wie Linol- und Linolensäure sind für Säugetiere essentiell, da sie nicht von diesen selbst hergestellt werden können. Deshalb stellen mehrfach ungesättigte ω -3-Fettsäuren und ω -6-Fettsäuren einen wichtigen Bestandteil der tierischen und menschlichen Nahrung dar.

Mehrfach ungesättigte langkettige ω -3-Fettsäuren wie Eicosapentaensäure (= EPA, C20:5 ^{Δ 5,8,11,14,17}) oder Docosahexaensäure (= DHA, C22:6 ^{Δ 4,7,10,13,16,19}) sind wichtige Komponenten der menschlichen Ernährung aufgrund ihrer verschiedenen Rollen in der Gesundheit, die Aspekte wie die Entwicklung des kindlichen Gehirns, der Funktionalität des Auges, der Synthese von Hormonen und anderer Signalstoffe, sowie die Vorbeugung von Herz-Kreislauf-Beschwerden, Krebs und Diabetes umfassen (Poulos, A Lipids 30:1-14, 1995; Horrocks, LA und Yeo YK Pharmacol Res 40:211-225, 1999). Es besteht aus diesem Grund ein Bedarf an der Produktion mehrfach ungesättigter langkettiger Fettsäuren.

Aufgrund der heute üblichen Zusammensetzung der menschlichen Nahrung ist ein Zusatz von mehrfach ungesättigten ω -3-Fettsäuren, die bevorzugt in Fischölen vorkommen, zur Nahrung besonders wichtig. So werden beispielsweise mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Docosahexaensäure (= DHA, C22:6 ^{Δ 4,7,10,13,16,19}) oder Eicosapentaensäure (= EPA, C20:5 ^{Δ 5,8,11,14,17}) Babynahrung zur Erhöhung des Nährwertes zugesetzt. Der ungesättigten Fettsäure DHA wird dabei ein positiver Effekt auf die Entwicklung und Aufrechterhaltung von Gehirnfunktionen zugeschrieben.

Im folgenden werden mehrfach ungesättigte Fettsäuren als PUFA, PUFAs, LCPUFA oder LCPUFAs bezeichnet (poly unsaturated fatty acids, PUFA, mehrfach ungesättigte Fettsäuren; long chain poly unsaturated fatty acids, LCPUFA, langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren).

Hauptsächlich werden die verschiedenen Fettsäuren und Triglyceride aus Mikroorganismen wie Mortierella oder Schizochytrium oder aus Öl-produzierenden Pflanzen wie Soja, Raps, Algen wie Cryptocodinium oder Phaeodactylum und weiteren gewonnen, wobei sie in der Regel in Form ihrer Triacylglyceride (= Triglyceride = Triglycerole) anfallen. Sie können aber auch aus Tieren wie z.B. Fischen gewonnen werden. Die freien Fettsäuren werden vorteilhaft durch Verseifung hergestellt. Sehr langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie DHA, EPA, Arachidonsäure (= ARA, C20:4 ^{Δ 5,8,11,14}), Dihomo- γ -linolensäure (C20:3 ^{Δ 8,11,14}) oder Docosapentaensäure (DPA, C22:5 ^{Δ 7,10,13,16,19}) werden in Ölfruchtpflanzen wie Raps, Soja, Sonnenblume, Färbersafflor nicht synthetisiert. Übliche natürliche Quellen für diese Fettsäuren sind Fische wie Hering, Lachs, Sardine, Goldbarsch, Aal, Karpfen, Forelle, Heilbutt, Makrele, Zander oder Thunfisch oder Algen.

Je nach Anwendungszweck werden Öle mit gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren bevorzugt. So werden z.B. in der humanen Ernährung Lipide mit ungesättigten Fettsäuren speziell mehrfach ungesättigten Fettsäuren bevorzugt. Den mehrfach ungesättigten ω -3-Fettsäuren wird dabei ein positiver Effekt auf den Cholesterinspiegel im Blut und damit auf die Möglichkeit der Prävention einer Herzerkrankung zugeschrieben. Durch Zugabe dieser ω -3-Fettsäuren zur Nahrung kann das Risiko einer Herzerkrankung, eines Schlaganfalls oder von Bluthochdruck deutlich verringert werden. Auch entzündliche speziell chronisch entzündliche Prozesse im Rahmen immunologischer Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis lassen sich durch ω -3-Fettsäuren positiv beeinflussen. Sie werden deshalb Lebensmitteln speziell diätischen Lebensmitteln zugegeben oder finden in Medikamenten Anwendung. ω -6-Fettsäuren wie Arachidonsäure haben bei diesen rheumatischen Erkrankungen aufgrund unserer üblichen Nahrungsmittelzusammensetzung eher einen negativen Effekt auf diese Krankheiten.

ω -3- und ω -6-Fettsäuren sind Vorläufer von Gewebshormonen, den sogenannten Eicosanoiden wie den Prostaglandinen, die sich von der Dihomo- γ -linolensäure, der Arachidonsäure und der Eicosapentaensäure ableiten, den Thromoxanen und Leukotrienen, die sich von der Arachidonsäure und der Eicosapentaensäure ableiten.

Eicosanoide (sog. PG₂-Serie), die aus ω -6-Fettsäuren gebildet werden fördern in der Regel Entzündungsreaktionen, während Eicosanoide (sog. PG₃-Serie) aus ω -3-Fettsäuren geringe oder keine entzündungsfördernde Wirkung haben.

Aufgrund ihrer positiven Eigenschaften hat es in der Vergangenheit nicht an Ansätzen
5 gefehlt, Gene, die an der Synthese von Fettsäuren bzw. Triglyceriden beteiligt sind, für
die Herstellung von Ölen in verschiedenen Organismen mit geändertem Gehalt an
ungesättigten Fettsäuren verfügbar zu machen. So wird in WO 91/13972 und seinem
US-Äquivalent eine Δ -9-Desaturase beschrieben. In WO 93/11245 wird eine Δ -15-
Desaturase in WO 94/11516 wird eine Δ -12-Desaturase beansprucht. Weitere
10 Desaturasen werden beispielsweise in EP-A-0 550 162, WO 94/18337, WO 97/30582,
WO 97/21340, WO 95/18222, EP-A-0 794 250, Stukey et al., J. Biol. Chem., 265,
1990: 20144-20149, Wada et al., Nature 347, 1990: 200-203 oder Huang et al., Lipids
34, 1999: 649-659 beschrieben. Die biochemische Charakterisierung der verschie-
denen Desaturasen ist jedoch bisher nur unzureichend erfolgt, da die Enzyme als
15 membrangebundene Proteine nur sehr schwer zu isolieren und zu charakterisieren
sind (McKeon et al., Methods in Enzymol. 71, 1981: 12141-12147, Wang et al., Plant
Physiol. Biochem., 26, 1988: 777-792). In der Regel erfolgt die Charakterisierung
membrangebundener Desaturasen durch Einbringung in einen geeigneten Organis-
mus, der anschließend auf Enzymaktivität mittels Edukt- und Produktanalyse unter-
20 sucht wird. Δ -6-Desaturasen werden in WO 93/06712, US 5,614,393, US5614393,
WO 96/21022, WO00/21557 und WO 99/27111 beschrieben und auch die Anwendung
zur Produktion in transgenen Organismen beschrieben wie in WO98/46763
WO98/46764, WO9846765. Dabei wird auch die Expression verschiedener Desatura-
sen wie in WO99/64616 oder WO98/46776 und Bildung polyungesättigter Fettsäuren
25 beschrieben und beansprucht. Bzgl. der Effektivität der Expression von Desaturasen
und ihren Einfluss auf die Bildung polyungesättigter Fettsäuren ist anzumerken, dass
durch Expression einer einzelnen Desaturase wie bisher beschrieben lediglich geringe
Gehalte an ungesättigten Fettsäuren/Lipiden wie z.B. γ -Linolensäure und Stearidon-
säure erreicht wurden. Weiterhin wurde in der Regel ein Gemisch aus ω -3- und ω -6-
30 Fettsäuren erhalten.

Besonders geeignete Mikroorganismen zur Herstellung von PUFAs sind Mikro-
organismen wie Mikroalgen wie *Phaeodactylum tricornutum*, *Porphiridium*-Arten,
Thraustochytrien-Arten, Schizochytrien-Arten oder *Cryptocodium*-Arten, Ciliaten,
wie *Stylonychia* oder *Colpidium*, Pilze, wie *Mortierella*, *Entomophthora* oder *Mucor*
35 und/oder Moosen wie *Physcomitrella*, *Ceratodon* und *Marchantia* (R. Vazhappilly & F.
Chen (1998) *Botanica Marina* 41: 553-558; K. Totani & K. Oba (1987) *Lipids* 22: 1060-
1062; M. Akimoto et al. (1998) *Appl. Biochemistry and Biotechnology* 73: 269-278).
Durch Stammselektion ist eine Anzahl von Mutantenstämmen der entsprechenden
Mikroorganismen entwickelt worden, die eine Reihe wünschenswerter Verbindungen,
40 einschließlich PUFAs, produzieren. Die Mutation und Selektion von Stämmen mit
verbesserter Produktion eines bestimmten Moleküls wie den mehrfach ungesättigten
Fettsäuren ist jedoch ein zeitraubendes und schwieriges Verfahren. Deshalb werden,
wann immer möglich wie oben beschrieben gentechnologische Verfahren bevorzugt.

Mit Hilfe der vorgenannten Mikroorganismen lassen sich jedoch nur begrenzte Mengen der gewünschten mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie DPA, EPA oder ARA herstellen. Wobei diese in der Regel je nach verwendeten Mikroorganismus als Fettsäuregemische aus beispielsweise EPA, DPA und ARA anfallen.

- 5 Für die Synthese von Arachidonsäure, Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) werden verschiedene Synthesewege diskutiert (Figur. 1). So erfolgt die Produktion von EPA bzw. DHA in marinen Bakterien wie *Vibrio* sp. oder *Shewanella* sp. nach dem Polyketid-Weg (Yu, R. et al. *Lipids* 35:1061-1064, 2000; Takeyama, H. et al. *Microbiology* 143:2725-2731, 1997).
- 10 Ein alternative Strategie verläuft über die wechselnde Aktivität von Desaturasen und Elongasen (Zank, T.K. et al. *Plant Journal* 31:255-268, 2002; Sakuradani, E. et al. *Gene* 238:445-453, 1999). Eine Modifikation des beschriebenen Weges über $\Delta 6$ -Desaturase, $\Delta 6$ -Elongase, $\Delta 5$ -Desaturase, $\Delta 5$ -Elongase, $\Delta 4$ -Desaturase ist der Sprecher-Syntheseweg (Sprecher 2000, *Biochim. Biophys. Acta* 1486:219-231) in
- 15 Säugetieren. Anstelle der $\Delta 4$ -Desaturierung erfolgt hier ein weiterer Elongationsschritt auf C_{24} , eine weitere $\Delta 6$ -Desaturierung und abschliessend eine β -Oxidation auf die C_{22} -Kettenlänge. Für die Herstellung in Pflanzen und Mikroorganismen ist der sogenannte Sprecher-Syntheseweg (siehe Figur 1) allerdings nicht geeignet, da die Regulationsmechanismen nicht bekannt sind.
- 20 Die polyungesättigten Fettsäuren können entsprechend ihrem Desaturierungsmuster in zwei große Klassen, in ω -6- oder ω -3-Fettsäuren eingeteilt werden, die metabolisch und funktionell unterschiedlich Aktivitäten haben (Fig. 1).

- Als Ausgangsprodukt für den ω -6-Stoffwechselweg fungiert die Fettsäure Linolsäure ($18:2^{\Delta 9,12}$), während der ω -3-Weg über Linolensäure ($18:3^{\Delta 9,12,15}$) abläuft. Linolensäure
- 25 wird dabei durch Aktivität einer ω -3-Desaturase gebildet (Tocher et al. 1998, *Prog. Lipid Res.* 37, 73-117 ; Domergue et al. 2002, *Eur. J. Biochem.* 269, 4105-4113).

- Säugetiere und damit auch der Mensch verfügen über keine entsprechende Desaturaseaktivität (Δ -12- und ω -3-Desaturase) und müssen diese Fettsäuren (essentielle Fettsäuren) über die Nahrung aufnehmen. Über die Abfolge von Desaturase- und
- 30 Elongase-Reaktionen werden dann aus diesen Vorstufen die physiologisch wichtigen polyungesättigten Fettsäuren Arachidonsäure (= ARA, $20:4^{\Delta 5,8,11,14}$), eine ω -6-Fettsäure und die beiden ω -3-Fettsäuren Eicosapentaen- (= EPA, $20:5^{\Delta 5,8,11,14,17}$) und Docosahexaensäure (DHA, $22:6^{\Delta 4,7,10,13,17,19}$) synthetisiert. Die Applikation von ω -3-Fettsäuren zeigt dabei die wie oben beschrieben therapeutische Wirkung bei der Behandlung von
- 35 Herz-Kreislaufkrankheiten (Shimikawa 2001, *World Rev. Nutr. Diet.* 88, 100-108), Entzündungen (Calder 2002, *Proc. Nutr. Soc.* 61, 345-358) und Arthridis (Cleland und James 2000, *J. Rheumatol.* 27, 2305-2307).

- Die Verlängerung von Fettsäuren durch Elongasen um 2 bzw. 4 C-Atome ist für die Produktion von C_{20} - bzw. C_{22} -PUFAs von entscheidender Bedeutung. Dieser Prozess verläuft über 4 Stufen. Der erste Schritt stellt die Kondensation von Malonyl-CoA an
- 40

das Fettsäure-Acyl-CoA durch die Ketoacyl-CoA-Synthase (KCS, im weiteren Text als Elongase bezeichnet). Es folgt dann ein Reduktionsschritt (Ketoacyl-CoA-Reduktase, KCR), ein Dehydratationsschritt (Dehydratase) und ein abschliessender Reduktionsschritt (enoyl-CoA-Reduktase). Es wurde postuliert, dass die Aktivität der Elongase die Spezifität und Geschwindigkeit des gesamten Prozesses beeinflussen (Millar and Kunst, 1997 Plant Journal 12:121-131).

In der Vergangenheit wurden zahlreiche Versuche unternommen, Elongase Gene zu erhalten. Millar and Kunst, 1997 (Plant Journal 12:121-131) und Millar et al. 1999, (Plant Cell 11:825-838) beschreiben die Charakterisierung von pflanzlichen Elongasen zur Synthese von einfachungesättigten langkettigen Fettsäuren (C22:1) bzw. zur Synthese von sehr langkettigen Fettsäuren für die Wachsbildung in Pflanzen (C₂₈-C₃₂). Beschreibungen zur Synthese von Arachidonsäure und EPA finden sich beispielsweise in WO0159128, WO0012720, WO02077213 und WO0208401. Die Synthese von mehrfachungesättigter C24 Fettsäuren ist beispielsweise in Tvrdik et al 2000, JCB 149:707-717 oder WO0244320 beschrieben.

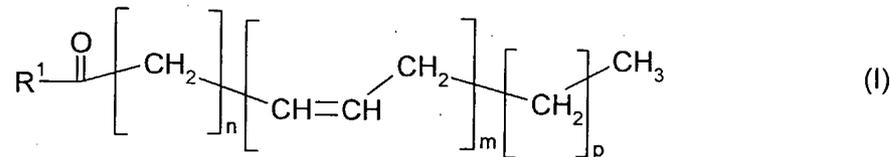
Zur Herstellung von DHA (C22:6 n-3) in Organismen, die diese Fettsäure natürlicherweise nicht produzieren, wurde bisher keine spezifische Elongase beschrieben. Bisher wurden nur Elongasen beschrieben, die C₂₀- bzw. C₂₄-Fettsäuren bereitstellen. Eine Δ -5-Elongase-Aktivität wurde bisher noch nicht beschrieben.

Höhere Pflanzen enthalten mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Linolsäure (C18:2) und Linolensäure (C18:3). ARA, EPA und DHA kommen im Samenöl höherer Pflanzen gar nicht oder nur in Spuren vor (E. Ucciani: Nouveau Dictionnaire des Huiles Végétales. Technique & Documentation – Lavoisier, 1995. ISBN: 2-7430-0009-0). Es wäre jedoch vorteilhaft, in höheren Pflanzen, bevorzugt in Ölsaaten wie Raps, Lein, Sonnenblume und Soja, LCPUFAs herzustellen, da auf diese Weise große Mengen qualitativ hochwertiger LCPUFAs für die Lebensmittelindustrie, die Tierernährung und für pharmazeutische Zwecke kostengünstig gewonnen werden können. Hierzu müssen vorteilhaft über gentechnische Methoden Gene kodierend für Enzyme der Biosynthese von LCPUFAs in Ölsaaten eingeführt und exprimiert werden. Dies sind Gene, die beispielsweise für Δ -6-Desaturasen, Δ -6-Elongasen, Δ -5-Desaturasen oder Δ -4-Desaturasen codieren. Diese Gene können vorteilhaft aus Mikroorganismen und niederen Pflanzen isoliert werden, die LCPUFAs herstellen und in den Membranen oder Triacylglyceriden einbauen. So konnten bereits Δ -6-Desaturase-Gene aus dem Moos Physcomitrella patens und Δ -6-Elongase-Gene aus P. patens und dem Nematoden C. elegans isoliert.

Erste transgene Pflanzen, die Gene kodierend für Enzyme der LCPUFA-Biosynthese enthalten und exprimieren und LCPUFAs produzieren wurden beispielsweise in DE 102 19 203 (Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren in Pflanzen) erstmals beschrieben. Diese Pflanzen produzieren allerdings LCPUFAs in Mengen, die für eine Aufarbeitung der in den Pflanzen enthaltenen Öle noch weiter optimiert werden müssen.

Um eine Anreicherung der Nahrung und des Futters mit diesen mehrfach ungesättigten Fettsäuren zu ermöglichen, besteht daher ein großer Bedarf an einem einfachen, kostengünstigen Verfahren zur Herstellung dieser mehrfach ungesättigten Fettsäuren speziell in eukaryontischen Systemen.

- 5 Es bestand daher die Aufgabe weitere Gene bzw. Enzyme, die für die Synthese von LCPUFAs geeignet sind, speziell Gene, die eine Δ -5-Desaturase-, Δ -4-Desaturase-, Δ -12-Desaturase- oder Δ -6-Desaturaseaktivität aufweisen, für die Herstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren zur Verfügung zu stellen. Eine weitere Aufgabe dieser Erfindung war die Bereitstellung von Genen bzw. Enzymen, die eine Verschiebung von den ω -6-Fettsäuren zu den ω -3-Fettsäuren hin ermöglichen. Weiterhin bestand die Aufgabe ein Verfahren zur Herstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in einem Organismus vorteilhaft in einem eukaryontischen Organismus bevorzugt in einer Pflanze oder einem Mikroorganismus zu entwickeln. Diese Aufgabe wurde durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der
- 10
15 allgemeinen Formel I



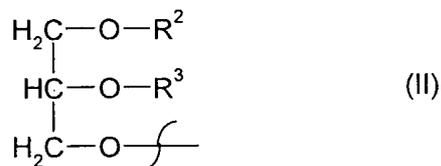
in transgenen Organismen mit einem Gehalt von mindestens 1 Gew.-% dieser Verbindungen bezogen auf den Gesamtlipidgehalt des transgenen Organismus, dadurch gekennzeichnet, dass es folgende Verfahrensschritte umfasst:

- 20 a) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, welche für eine Δ -6-Desaturase-Aktivität codiert, und
- b) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, welche für eine Δ -6-Elongase-Aktivität codiert, und
- 25 c) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, welche für eine Δ -5-Desaturase-Aktivität codiert, und
- d) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, welche für eine Δ -5-Elongase-Aktivität codiert, und
- e) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, welche für eine Δ -4-Desaturase-Aktivität codiert, und

30 wobei die Variablen und Substituenten in der Formel I die folgende Bedeutung haben:

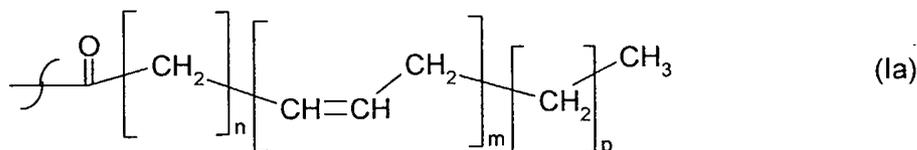
$\text{R}^1 =$ Hydroxyl-, CoenzymA-(Thioester), Lyso-Phosphatidylcholin-, Lyso-Phosphatidylethanolamin-, Lyso-Phosphatidylglycerol-, Lyso-Diphosphatidylglycerol-, Lyso-Phosphatidylserin-, Lyso-

Phosphatidylinositol-, Sphingobase-, oder einen Rest der allgemeinen Formel II



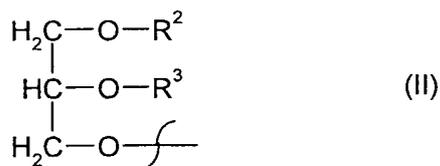
5 $\text{R}^2 =$ Wasserstoff-, Lyso-Phosphatidylcholin-, Lyso-Phosphatidylethanolamin-, Lyso-Phosphatidylglycerol-, Lyso-Diphosphatidylglycerol-, Lyso-Phosphatidylserin-, Lyso-Phosphatidylinositol- oder gesättigtes oder ungesättigtes $\text{C}_2\text{-C}_{24}$ -Alkylcarbonyl-,

10 $\text{R}^3 =$ Wasserstoff-, gesättigtes oder ungesättigtes $\text{C}_2\text{-C}_{24}$ -Alkylcarbonyl-, oder R^2 oder R^3 unabhängig voneinander einen Rest der allgemeinen Formel Ia:



$n = 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 9 , $m = 2, 3, 4, 5$ oder 6 und $p = 0$ oder 3 , gelöst.

15 R^1 bedeutet in der allgemeinen Formel I Hydroxyl-, CoenzymA-(Thioester), Lyso-Phosphatidylcholin-, Lyso-Phosphatidylethanolamin-, Lyso-Phosphatidylglycerol-, Lyso-Diphosphatidylglycerol-, Lyso-Phosphatidylserin-, Lyso-Phosphatidylinositol-, Sphingobase-, oder einen Rest der allgemeinen Formel II



Die oben genannten Reste von R^1 sind immer in Form ihrer Thioester an die Verbindungen der allgemeinen Formel I gebunden.

20 R^2 bedeutet in der allgemeinen Formel II Wasserstoff-, Lyso-Phosphatidylcholin-, Lyso-Phosphatidylethanolamin-, Lyso-Phosphatidylglycerol-, Lyso-Diphosphatidylglycerol-, Lyso-Phosphatidylserin-, Lyso-Phosphatidylinositol- oder gesättigtes oder ungesättigtes $\text{C}_2\text{-C}_{24}$ -Alkylcarbonyl-,

25 Als Alkylreste seien substituiert oder unsubstituiert, gesättigt oder ungesättigte $\text{C}_2\text{-C}_{24}$ -Alkylcarbonyl-Ketten wie Ethylcarbonyl-, n-Propylcarbonyl-, n-Butylcarbonyl-, n-Pentyl-

carbonyl-, n-Hexylcarbonyl-, n-Heptylcarbonyl-, n-Octylcarbonyl-, n-Nonylcarbonyl-, n-Decylcarbonyl-, n-Undecylcarbonyl-, n-Dodecylcarbonyl-, n-Tridecylcarbonyl-, n-Tetradecylcarbonyl-, n-Pentadecylcarbonyl-, n-Hexadecylcarbonyl-, n-Heptadecylcarbonyl-, n-Octadecylcarbonyl-, n-Nonadecylcarbonyl-, n-Eicosylcarbonyl-,
5 n-Docosanylcarbonyl- or n-Tetracosanylcarbonyl- genannt, die ein oder mehrere Doppelbindungen enthalten. Gesättigte oder ungesättigte C₁₀-C₂₂-Alkylcarbonylreste wie n-Decylcarbonyl-, n-Undecylcarbonyl-, n-Dodecylcarbonyl-, n-Tridecylcarbonyl-, n-Tetradecylcarbonyl-, n-Pentadecylcarbonyl-, n-Hexadecylcarbonyl-, n-Heptadecylcarbonyl-, n-Octadecylcarbonyl-, n-Nonadecylcarbonyl-, n-Eicosylcarbonyl-,
10 n-Docosanylcarbonyl- oder n-Tetracosanylcarbonyl-, die ein oder mehrere Doppelbindungen enthalten, sind bevorzugt. Besonders bevorzugt sind gesättigte und/oder ungesättigte C₁₀-C₂₂-Alkylcarbonylreste wie C₁₀-Alkylcarbonyl-, C₁₁-Alkylcarbonyl-, C₁₂-Alkylcarbonyl-, C₁₃-Alkylcarbonyl-, C₁₄-Alkylcarbonyl-, C₁₆-Alkylcarbonyl-, C₁₈-Alkylcarbonyl-, C₂₀-Alkylcarbonyl- oder C₂₂-Alkylcarbonylreste, die ein oder mehrere
15 Doppelbindungen enthalten. Ganz besonders bevorzugt sind gesättigte oder ungesättigte C₁₆-C₂₂-Alkylcarbonylreste wie C₁₆-Alkylcarbonyl-, C₁₈-Alkylcarbonyl-, C₂₀-Alkylcarbonyl- oder C₂₂-Alkylcarbonylreste, die ein oder mehrere Doppelbindungen enthalten. Diese vorteilhaften Reste können zwei, drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen enthalten. Die besonders vorteilhaften Reste mit 20 oder 22 Kohlenstoff-
20 atomen in der Fettsäurekette enthalten bis zu sechs Doppelbindungen, vorteilhaft drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen, besonders bevorzugt fünf oder sechs Doppelbindungen. Alle genannten Reste leiten sich von den entsprechenden Fettsäuren ab.

R³ bedeutet in der allgemeinen Formel II Wasserstoff-, gesättigtes oder ungesättigtes C₂-C₂₄-Alkylcarbonyl.

25 Als Alkylreste seien substituiert oder unsubstituiert, gesättigt oder ungesättigte C₂-C₂₄-Alkylcarbonyl-Ketten wie Ethylcarbonyl-, n-Propylcarbonyl-, n-Butylcarbonyl-, n-Pentylcarbonyl-, n-Hexylcarbonyl-, n-Heptylcarbonyl-, n-Octylcarbonyl-, n-Nonylcarbonyl-, n-Decylcarbonyl-, n-Undecylcarbonyl-, n-Dodecylcarbonyl-, n-Tridecylcarbonyl-, n-Tetradecylcarbonyl-, n-Pentadecylcarbonyl-, n-Hexadecylcarbonyl-, n-Heptadecylcarbonyl-, n-Octadecylcarbonyl-, n-Nonadecylcarbonyl-, n-Eicosylcarbonyl-, n-Docosanylcarbonyl- or n-Tetracosanylcarbonyl- genannt, die ein oder mehrere
30 Doppelbindungen enthalten. Gesättigte oder ungesättigte C₁₀-C₂₂-Alkylcarbonylreste wie n-Decylcarbonyl-, n-Undecylcarbonyl-, n-Dodecylcarbonyl-, n-Tridecylcarbonyl-, n-Tetradecylcarbonyl-, n-Pentadecylcarbonyl-, n-Hexadecylcarbonyl-, n-Heptadecylcarbonyl-, n-Octadecylcarbonyl-, n-Nonadecylcarbonyl-, n-Eicosylcarbonyl-, n-Docosanylcarbonyl- oder n-Tetracosanylcarbonyl-, die ein oder mehrere Doppelbindungen enthalten, sind bevorzugt. Besonders bevorzugt sind gesättigte und/oder ungesättigte C₁₀-C₂₂-Alkylcarbonylreste wie C₁₀-Alkylcarbonyl-, C₁₁-Alkylcarbonyl-, C₁₂-Alkylcarbonyl-, C₁₃-Alkylcarbonyl-, C₁₄-Alkylcarbonyl-, C₁₆-Alkylcarbonyl-, C₁₈-Alkylcarbonyl-, C₂₀-Alkylcarbonyl- oder C₂₂-Alkylcarbonylreste, die ein oder mehrere
35 Doppelbindungen enthalten. Ganz besonders bevorzugt sind gesättigte oder ungesättigte C₁₆-C₂₂-Alkylcarbonylreste wie C₁₆-Alkylcarbonyl-, C₁₈-Alkylcarbonyl-, C₂₀-Alkylcarbonyl- oder C₂₂-Alkylcarbonylreste, die ein oder mehrere Doppelbindungen
40

enthalten. Diese vorteilhaften Reste können zwei, drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen enthalten. Die besonders vorteilhaften Reste mit 20 oder 22 Kohlenstoffatomen in der Fettsäurekette enthalten bis zu sechs Doppelbindungen, vorteilhaft drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen, besonders bevorzugt fünf oder sechs Doppelbindungen. Alle genannten Reste leiten sich von den entsprechenden Fettsäuren ab.

Die oben genannten Reste von R^1 , R^2 and R^3 können mit Hydroxyl- und/oder Epoxygruppen substituierte sein und/oder können Dreifachbindungen enthalten.

Vorteilhaft enthalten die im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mindestens zwei vorteilhaft drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen. Besonders vorteilhaft enthalten die Fettsäuren vier fünf oder sechs Doppelbindungen. Im Verfahren hergestellte Fettsäuren haben vorteilhaft 18-, 20- oder 22-C-Atome in der Fettsäurekette, bevorzugt enthalten die Fettsäuren 20 oder 22 Kohlenstoffatome in der Fettsäurekette. Vorteilhaft werden gesättigte Fettsäuren mit den im Verfahren verwendeten Nucleinsäuren wenig oder gar nicht umgesetzt. Unter wenig ist zu verstehen, das im Vergleich zu mehrfach ungesättigten Fettsäuren die gesättigten Fettsäuren mit weniger als 5 % der Aktivität, vorteilhaft weniger als 3 %, besonders vorteilhaft mit weniger als 2 %, ganz besonders bevorzugt mit weniger als 1; 0,5; 0,25 oder 0,125 % umgesetzt werden. Diese hergestellten Fettsäuren können als einziges Produkt im Verfahren hergestellt werden oder in einem Fettsäuregemisch vorliegen.

Bei den im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nucleinsäuresequenzen handelt es sich um isolierte Nucleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit Δ -6-Desaturase-, Δ -6-Elongase-, Δ -5-Desaturase-, Δ -5-Elongase- und/oder Δ -4-Desaturaseaktivität codieren.

Vorteilhaft werden im erfindungsgemäßen Verfahren Nucleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit Δ -6-Desaturase-, Δ -6-Elongase-, Δ -5-Desaturase-, Δ -5-Elongase- oder Δ -4-Desaturaseaktivität codieren, verwendet ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- a) einer Nucleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 oder SEQ ID NO: 13 dargestellten Sequenz, oder
- b) Nucleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von den in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 oder SEQ ID NO: 14 dargestellten Aminosäuresequenzen ableiten lassen, oder
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 oder SEQ ID NO: 13 dargestellten Nucleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ

ID NO: 12 oder SEQ ID NO: 14 codieren und eine Δ -6-Desaturase-, Δ -6-Elongase-, Δ -5-Desaturase-, Δ -5-Elongase- oder Δ -4-Desaturaseaktivität aufweisen.

Vorteilhaft bedeuten die Substituenten R² oder R³ in den allgemeinen Formeln I und II unabhängig voneinander gesättigtes oder ungesättigtes C₁₈-C₂₂-Alkylcarbonyl-,
 5 besonders vorteilhaft bedeuten sie unabhängig voneinander ungesättigtes C₁₈-, C₂₀- oder C₂₂-Alkylcarbonyl- mit mindestens zwei Doppelbindungen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Verfahrens dadurch gekennzeichnet, dass eine Nukleinsäuresequenz zusätzlich in den Organismus eingebracht wird, die für Polypeptide mit Δ -12-Desaturaseaktivität codiert, ausgewählt aus der
 10 Gruppe bestehend aus:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 15 dargestellten Sequenz, oder
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 16 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
 15
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 15 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 50 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 16 codieren und eine Δ -12-Desaturaseaktivität aufweisen.

Diese vorgenannten Δ -12-Desaturasesequenzen können allein oder in Kombination mit den ω 3-Desaturasesequenzen mit den im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen, die für Δ -6-Desaturasen, Δ -6-Elongasen, Δ -5-Desaturasen, Δ -5-Elongasen und/oder Δ -4-Desaturasen codieren verwendet werden.
 20

Tabelle 1 gibt die Nukleinsäuresequenzen, den Herkunftsorganismus und die Sequenz-ID-Nummer wieder.

Nr.	Organismus	Aktivität	Sequenznummer
1.	Ostreococcus tauri	Δ -5-Elongase	SEQ ID NO: 1
2.	Ostreococcus tauri	Δ -5-Elongase	SEQ ID NO: 3
3.	Ostreococcus tauri	Δ -6-Elongase	SEQ ID NO: 5
4.	Ostreococcus tauri	Δ -4-Desaturase	SEQ ID NO: 7
5.	Ostreococcus tauri	Δ -5-Desaturase	SEQ ID NO: 9
6.	Ostreococcus tauri	Δ -5-Desaturase	SEQ ID NO: 11
7.	Ostreococcus tauri	Δ -6-Desaturase	SEQ ID NO: 13
8.	Ostreococcus tauri	Δ -12-Desaturase	SEQ ID NO: 15

Die im Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind vorteilhaft in Membranlipiden und/oder Triacylglyceriden gebunden, können aber auch als freie Fettsäuren oder aber gebunden in Form anderer Fettsäureester in den Organismen vorkommen. Dabei können sie als "Reinprodukte" oder aber vorteilhaft in Form von

5 Mischungen verschiedener Fettsäuren oder Mischungen unterschiedlicher Glyceride vorliegen. Die in den Triacylglyceriden gebundenen verschiedenen Fettsäuren lassen sich dabei von kurzkettigen Fettsäuren mit 4 bis 6 C-Atomen, mittelkettigen Fettsäuren mit 8 bis 12 C-Atomen oder langkettigen Fettsäuren mit 14 bis 24 C-Atomen ableiten, bevorzugt sind die langkettigen Fettsäuren besonders bevorzugt sind die langkettigen

10 Fettsäuren LCPUFAs von C₁₈-, C₂₀- und/oder C₂₂-Fettsäuren.

Im erfindungsgemäßen Verfahren werden vorteilhaft Fettsäureester mit mehrfach ungesättigten C₁₈-, C₂₀- und/oder C₂₂-Fettsäuremolekülen mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäureester, vorteilhaft mit mindestens drei, vier, fünf oder

15 sechs Doppelbindungen im Fettsäureester, besonders vorteilhaft von mindestens fünf oder sechs Doppelbindungen im Fettsäureester hergestellt und führen vorteilhaft zur Synthese von Linolsäure (=LA, C18:2^{Δ^{9,12}}), γ-Linolensäure (= GLA, C18:3^{Δ^{6,9,12}}), Stearidonsäure (= SDA, C18:4^{Δ^{6,9,12,15}}), Dihomo-γ-Linolensäure (= DGLA, 20:3^{Δ^{8,11,14}}), ω-3-Eicosatetraensäure (= ETA, C20:4^{Δ^{5,8,11,14}}), Arachidonsäure (ARA, C20:4^{Δ^{5,8,11,14}}), Eicosapentaensäure (EPA, C20:5^{Δ^{5,8,11,14,17}}), ω-6-Docosapentaensäure

20 (C22:5^{Δ^{4,7,10,13,16}}), ω-6-Docosatetraensäure (C22:4^{Δ^{7,10,13,16}}), ω-3-Docosapentaensäure (= DPA, C22:5^{Δ^{7,10,13,16,19}}), Docosahexaensäure (= DHA, C22:6^{Δ^{4,7,10,13,16,19}}) oder deren Mischungen, bevorzugt ARA, EPA und/oder DHA. Ganz besonders bevorzugt werden, ω-3-Fettsäuren wie EPA und/oder DHA hergestellt.

Die Fettsäureester mit mehrfach ungesättigten C₁₈-, C₂₀- und/oder C₂₂-Fettsäuremolekülen können aus den Organismen, die für die Herstellung der Fettsäureester verwendet wurden, in Form eines Öls oder Lipids beispielsweise in Form von Verbindungen wie Sphingolipide, Phosphoglyceride, Lipide, Glycolipide wie Glycosphingolipide, Phospholipide wie Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerol, Phosphatidylinositol oder Diphosphatidylglycerol, Monoacylglyceride, Diacylglyceride, Triacylglyceride oder sonstige Fettsäureester wie die AcetylCoenzymA-Ester, die die mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens

25 zwei, drei, vier, fünf oder sechs bevorzugt fünf oder sechs Doppelbindungen enthalten, isoliert werden, vorteilhaft werden sie in der Form ihrer Diacylglyceride, Triacylglyceride und/oder in Form des Phosphatidylcholin isoliert, besonders bevorzugt in der Form der

35 Triacylglyceride. Neben diesen Estern sind die mehrfach ungesättigten Fettsäuren auch als freie Fettsäuren oder gebunden in anderen Verbindungen in den Organismen vorteilhaft den Pflanzen enthalten. In der Regel liegen die verschiedenen vorgenannten Verbindungen (Fettsäureester und frei Fettsäuren) in den Organismen in einer ungefähren Verteilung von 80 bis 90 Gew.-% Triglyceride, 2 bis 5 Gew.-% Diglyceride, 5 bis

40 10 Gew.-% Monoglyceride, 1 bis 5 Gew.-% freie Fettsäuren, 2 bis 8 Gew.-% Phospholipide vor, wobei sich die Summe der verschiedenen Verbindungen zu 100 Gew.-% ergänzt.

Im erfindungsgemäßen Verfahren werden die hergestellten LCPUFAs mit einem Gehalt von mindestens 3 Gew.-%, vorteilhaft von mindestens 5 Gew.-%, bevorzugt von mindestens 8 Gew.-%, besonders bevorzugt von mindestens 10 Gew.-%, ganz besonders bevorzugt von mindestens 15 Gew.-% bezogen auf die gesamten Fettsäuren in den transgenen Organismen vorteilhaft in einer transgenen Pflanze hergestellt. Dabei werden vorteilhaft C₁₈- und/oder C₂₀-Fettsäuren, die in den Wirtsorganismen vorhanden sind, zu mindestens 10 %, vorteilhaft zu mindestens 20 %, besonders vorteilhaft zu mindestens 30 %, ganz besonders vorteilhaft zu mindestens 40 % in die entsprechenden Produkte wie DPA oder DHA, um nur zwei beispielhaft zu nennen, umgesetzt. Vorteilhaft werden die Fettsäuren in gebundener Form hergestellt. Mit Hilfe der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren lassen sich diese ungesättigten Fettsäuren an sn1-, sn2- und/oder sn3-Position der vorteilhaft hergestellten Triglyceride bringen. Da im erfindungsgemäßen Verfahren von den Ausgangsverbindungen Linolsäure (C18:2) bzw. Linolensäure (C18:3) mehrere Reaktionsschritte durchlaufen werden, fallen die Endprodukte des Verfahrens wie beispielsweise Arachidonsäure (ARA), Eicosapentaensäure (EPA), ω-6-Docosapentaensäure oder DHA nicht als absolute Reinprodukte an, es sind immer auch geringe Spuren der Vorstufen im Endprodukt enthalten. Sind in dem Ausgangsorganismus bzw. in der Ausgangspflanze beispielsweise sowohl Linolsäure als auch Linolensäure vorhanden, so liegen die Endprodukte wie ARA, EPA oder DHA als Mischungen vor. Die Vorstufen sollten vorteilhaft nicht mehr als 20 Gew.-%, bevorzugt nicht mehr als 15 Gew.-%, besonders bevorzugt nicht mehr als 10 Gew.-%, ganz besonders bevorzugt nicht mehr als 5 Gew.-% bezogen auf die Menge des jeweiligen Endproduktes betragen. Vorteilhaft werden in einer transgenen Pflanze als Endprodukte nur ARA, EPA oder nur DHA im erfindungsgemäßen Verfahren gebunden oder als freie Säuren hergestellt. Werden die Verbindungen ARA, EPA und DHA gleichzeitig hergestellt, werden sie vorteilhaft in einem Verhältnis von mindesten 1:1:2 (EPA:ARA:DHA), vorteilhaft von mindestens 1:1:3, bevorzugt von 1:1:4, besonders bevorzugt von 1:1:5 hergestellt.

Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden, enthalten vorteilhaft 6 bis 15 % Palmitinsäure, 1 bis 6 % Stearinsäure; 7 – 85 % Ölsäure; 0,5 bis 8 % Vaccensäure, 0,1 bis 1 % Arachinsäure, 7 bis 25 % gesättigte Fettsäuren, 8 bis 85 % einfach ungesättigte Fettsäuren und 60 bis 85 % mehrfach ungesättigte Fettsäuren jeweils bezogen auf 100 % und auf den Gesamtfettsäuregehalt der Organismen. Als vorteilhafte mehrfach ungesättigte Fettsäure sind in den Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische bevorzugt mindestens 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 oder 1 % bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt an Arachidonsäure enthalten. Weiterhin enthalten die Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden, vorteilhaft Fettsäuren ausgewählt aus der Gruppe der Fettsäuren Erucasäure (13-Docosaensäure), Sterculinsäure (9,10-Methylene octadec-9-enonsäure), Malvalinsäure (8,9-Methylen Heptadec-8-enonsäure), Chaulmoogrinsäure (Cyclopentendodecansäure), Furan-Fettsäure (9,12-Epoxy-octadeca-9,11-dienonsäure), Vernonsäure (9,10-Epoxyoctadec-12-enonsäure), Tarinsäure (6-Octadecynonsäure), 6-Nonadecynonsäure, Santalbinsäure (t11-Octadecen-9-ynoic acid), 6,9-

- Octadecenynonsäure, Pyrulinsäure (11-Heptadecen-8-ynonsäure), Crepenyninsäure (9-Octadecen-12-ynonsäure), 13,14-Dihydrooropheinsäure, Octadecen-13-ene-9,11-diynonsäure, Petroselensäure (cis-6-Octadecenonsäure), 9c,12t-Octadecadiensäure, Calendulasäure (8t10t12c-Octadecatriensäure), Catalpinsäure (9t11t13c-Octadecatriensäure), Eleosterinsäure (9c11t13t-Octadecatriensäure), Jacarinsäure (8c10t12c-Octadecatriensäure), Punicinsäure (9c11t13c-Octadecatriensäure), Parinarinsäure (9c11t13t15c-Octadecatetraensäure), Pinolensäure (all-cis-5,9,12-Octadecatriensäure), Laballensäure (5,6-Octadecadienallensäure), Ricinolsäure (12-Hydroxyölsäure) und/oder Coriolinsäure (13-Hydroxy-9c,11t-Octadecadienonsäure).
- 5 Die vorgenannten Fettsäuren kommen in den nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Fettsäureester bzw. Fettsäuregemischen in der Regel vorteilhaft nur in Spuren vor, das heißt sie kommen bezogen auf die Gesamtfettsäuren zu weniger als 30 %, bevorzugt zu weniger als 25 %, 24 %, 23 %, 22 % oder 21 %, besonders bevorzugt zu weniger als 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7%, 6 % oder 5%, ganz
- 10 besonders bevorzugt zu weniger als 4 %, 3 %, 2 % oder 1 % vor. Vorteilhaft enthalten die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische weniger als 0,1 % bezogen auf die Gesamtfettsäuren oder keine Buttersäure, kein Cholesterin, keine Clupanodonsäure (= Docosapentaensäure, C22:5^{Δ4,8,12,15,21}) sowie keine Nisinsäure (Tetracosahexaensäure, C23:6^{Δ3,8,12,15,18,21}).
- 15
- 20 Durch die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen bzw. im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen kann eine Steigerung der Ausbeute an mehrfach ungesättigten Fettsäuren von mindestens 50 %, vorteilhaft von mindestens 80 %, besonders vorteilhaft von mindestens 100 %, ganz besonders vorteilhaft von mindestens 150 % gegenüber den nicht transgenen Ausgangsorganismus
- 25 beispielsweise einer Hefe, einer Alge, einem Pilz oder einer Pflanze wie Arabidopsis oder Lein beim Vergleich in der GC-Analyse siehe Beispiele erreicht werden.
- Auch chemisch reine mehrfach ungesättigte Fettsäuren oder Fettsäurezusammensetzungen sind nach den vorbeschriebenen Verfahren darstellbar. Dazu werden die Fettsäuren oder die Fettsäurezusammensetzungen aus dem Organismus wie den
- 30 Mikroorganismen oder den Pflanzen oder dem Kulturmedium, in dem oder auf dem die Organismen angezogen wurden, oder aus dem Organismus und dem Kulturmedium in bekannter Weise beispielsweise über Extraktion, Destillation, Kristallisation, Chromatographie oder Kombinationen dieser Methoden isoliert. Diese chemisch reinen Fettsäuren oder Fettsäurezusammensetzungen sind für Anwendungen im Bereich
- 35 der Lebensmittelindustrie, der Kosmetikindustrie und besonders der Pharmaindustrie vorteilhaft.
- Als Organismus für die Herstellung im erfindungsgemäßen Verfahren kommen prinzipiell alle Organismen wie Mikroorganismen, nicht-humane Tiere oder Pflanzen in Frage.
- 40 Als Pflanzen kommen prinzipiell alle Pflanzen in Frage, die in der Lage sind Fettsäuren zu synthetisieren wie alle dicotylen oder monokotylen Pflanzen, Algen oder Moose.

Vorteilhaft Pflanzen sind ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzenfamilien Adelotheceae, Anacardiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Betulaceae, Boraginaceae, Brassicaceae, Bromeliaceae, Caricaceae, Cannabaceae, Convolvulaceae, Chenopodiaceae, Crypthecodiniaceae, Cucurbitaceae, Ditrichaceae, Elaeagnaceae, Ericaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Geraniaceae, Gramineae, Juglandaceae, Lauraceae, Leguminosae, Linaceae, Prasinophyceae oder Gemüsepflanzen oder Zierpflanzen wie Tagetes in Betracht.

Beispielhaft seien die folgenden Pflanzen genannt ausgewählt aus der Gruppe:

Adelotheciaceae wie die Gattungen *Physcomitrella* z.B. die Gattung und Arten
 10 *Physcomitrella patens*, Anacardiaceae wie die Gattungen *Pistacia*, *Mangifera*, *Anacardium* z.B. die Gattung und Arten *Pistacia vera* [Pistazie], *Mangifer indica* [Mango] oder *Anacardium occidentale* [Cashew], Asteraceae wie die Gattungen *Calendula*, *Carthamus*, *Centaurea*, *Cichorium*, *Cynara*, *Helianthus*, *Lactuca*, *Locusta*, *Tagetes*, *Valeriana* z.B. die Gattung und Arten *Calendula officinalis* [Garten-Ringelblume], *Carthamus tinctorius* [Färberdistel, safflower], *Centaurea cyanus* [Kornblume], *Cichorium intybus* [Wegwarte], *Cynara scolymus* [Artichoke], *Helianthus annus* [Sonnenblume], *Lactuca sativa*, *Lactuca crispera*, *Lactuca esculenta*, *Lactuca scariola* L. ssp. *sativa*, *Lactuca scariola* L. var. *integrata*, *Lactuca scariola* L. var. *integrifolia*, *Lactuca sativa* subsp. *romana*, *Locusta communis*, *Valeriana locusta* [Salat], *Tagetes lucida*, *Tagetes erecta*
 15 oder *Tagetes tenuifolia* [Studentenblume], Apiaceae wie die Gattung *Daucus* z.B. die Gattung und Art *Daucus carota* [Karotte], Betulaceae wie die Gattung *Corylus* z.B. die Gattungen und Arten *Corylus avellana* oder *Corylus colurna* [Haselnuss], Boraginaceae wie die Gattung *Borago* z.B. die Gattung und Art *Borago officinalis* [Borretsch], Brassicaceae wie die Gattungen *Brassica*, *Camelina*, *Melanosinapis*, *Sinapis*, *Arabidopsis* z.B. die Gattungen und Arten *Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp. [Raps],
 20 *Sinapis arvensis* *Brassica juncea*, *Brassica juncea* var. *juncea*, *Brassica juncea* var. *crispifolia*, *Brassica juncea* var. *foliosa*, *Brassica nigra*, *Brassica sinapioides*, *Camelina sativa*, *Melanosinapis communis* [Senf], *Brassica oleracea* [Futterrübe] oder *Arabidopsis thaliana*, Bromeliaceae wie die Gattungen *Anana*, *Bromelia* (*Ananas*) z.B. die Gattungen und Arten *Anana comosus*, *Ananas ananas* oder *Bromelia comosa*
 30 [Ananas], Caricaceae wie die Gattung *Carica* wie die Gattung und Art *Carica papaya* [Papaya], Cannabaceae wie die Gattung *Cannabis* wie die Gattung und Art *Cannabis sativa* [Hanf], Convolvulaceae wie die Gattungen *Ipomea*, *Convolvulus* z.B. die Gattungen und Arten *Ipomoea batatas*, *Ipomoea pandurata*, *Convolvulus batatas*,
 35 *Convolvulus tiliaceus*, *Ipomoea fastigiata*, *Ipomoea tiliacea*, *Ipomoea triloba* oder *Convolvulus panduratus* [Süßkartoffel, Batate], Chenopodiaceae wie die Gattung *Beta* wie die Gattungen und Arten *Beta vulgaris*, *Beta vulgaris* var. *altissima*, *Beta vulgaris* var. *Vulgaris*, *Beta maritima*, *Beta vulgaris* var. *perennis*, *Beta vulgaris* var. *conditiva* oder *Beta vulgaris* var. *esculenta* [Zuckerrübe], Crypthecodiniaceae wie die Gattung *Cryptecodinium* z.B. die Gattung und Art *Cryptecodinium cohnii*, Cucurbitaceae wie die Gattung *Cucurbita* z.B. die Gattungen und Arten *Cucurbita maxima*, *Cucurbita mixta*, *Cucurbita pepo* oder *Cucurbita moschata* [Kürbis], Cymbellaceae wie die Gattungen *Amphora*, *Cymbella*, *Okedenia*, *Phaeodactylum*, *Reimeria* z.B. die Gattung und Art *Phaeodactylum tricornutum*, Ditrichaceae wie die Gattungen *Ditrichaceae*,

Astomiopsis, Ceratodon, Chrysoblastella, Ditrichum, Distichium, Eccremidium,
 Lophidion, Philibertiella, Pleuridium, Saelania, Trichodon, Skottsbergia z.B. die
 Gattungen und Arten *Ceratodon antarcticus*, *Ceratodon columbiae*, *Ceratodon*
heterophyllus, *Ceratodon purpurascens*, *Ceratodon purpureus*, *Ceratodon purpureus*
 5 *ssp. convolutus*, *Ceratodon purpureus ssp. stenocarpus*, *Ceratodon purpureus var.*
rotundifolius, *Ceratodon ratodon*, *Ceratodon stenocarpus*, *Chrysoblastella chilensis*,
Ditrichum ambiguum, *Ditrichum brevisetum*, *Ditrichum crispatisimum*, *Ditrichum*
difficile, *Ditrichum falcifolium*, *Ditrichum flexicaule*, *Ditrichum giganteum*, *Ditrichum*
heteromallum, *Ditrichum lineare*, *Ditrichum lineare*, *Ditrichum montanum*, *Ditrichum*
 10 *montanum*, *Ditrichum pallidum*, *Ditrichum punctulatum*, *Ditrichum pusillum*, *Ditrichum*
pusillum var. tortile, *Ditrichum rhynchostegium*, *Ditrichum schimperi*, *Ditrichum tortile*,
Distichium capillaceum, *Distichium hagenii*, *Distichium inclinatum*, *Distichium macounii*,
Eccremidium floridanum, *Eccremidium whiteleggei*, *Lophidion strictus*, *Pleuridium*
acuminatum, *Pleuridium alternifolium*, *Pleuridium holdridgei*, *Pleuridium mexicanum*,
 15 *Pleuridium ravenelii*, *Pleuridium subulatum*, *Saelania glaucescens*, *Trichodon borealis*,
Trichodon cylindricus oder *Trichodon cylindricus var. oblongus*, Elaeagnaceae wie die
 Gattung *Elaeagnus* z.B. die Gattung und Art *Olea europaea* [Olive], Ericaceae wie die
 Gattung *Kalmia* z.B. die Gattungen und Arten *Kalmia latifolia*, *Kalmia angustifolia*,
Kalmia microphylla, *Kalmia polifolia*, *Kalmia occidentalis*, *Cistus chamaerhodendros*
 oder *Kalmia lucida* [Berglorbeer], Euphorbiaceae wie die Gattungen *Manihot*, *Janipha*,
 20 *Jatropha*, *Ricinus* z.B. die Gattungen und Arten *Manihot utilissima*, *Janipha manihot*,
Jatropha manihot, *Manihot aipil*, *Manihot dulcis*, *Manihot manihot*, *Manihot melanoba-*
sis, *Manihot esculenta* [Manihot] oder *Ricinus communis* [Rizinus], Fabaceae wie die
 Gattungen *Pisum*, *Albizia*, *Cathormion*, *Feuillea*, *Inga*, *Pithecolobium*, *Acacia*, *Mimosa*,
 25 *Medicago*, *Glycine*, *Dolichos*, *Phaseolus*, *Soja* z.B. die Gattungen und Arten *Pisum*
sativum, *Pisum arvense*, *Pisum humile* [Erbse], *Albizia berteriana*, *Albizia julibrissin*,
Albizia lebbeck, *Acacia berteriana*, *Acacia littoralis*, *Albizia berteriana*, *Albizia*
berteriana, *Cathormion berteriana*, *Feuillea berteriana*, *Inga fragrans*, *Pithecellobium*
berterianum, *Pithecellobium fragrans*, *Pithecolobium berterianum*, *Pseudalbizia*
 30 *berteriana*, *Acacia julibrissin*, *Acacia nemu*, *Albizia nemu*, *Feuillea julibrissin*, *Mimosa*
julibrissin, *Mimosa speciosa*, *Sericanrda julibrissin*, *Acacia lebbeck*, *Acacia macrophyl-*
la, *Albizia lebbeck*, *Feuillea lebbeck*, *Mimosa lebbeck*, *Mimosa speciosa* [Seidenbaum],
Medicago sativa, *Medicago falcata*, *Medicago varia* [Alfalfa] *Glycine max* *Dolichos soja*,
Glycine gracilis, *Glycine hispida*, *Phaseolus max*, *Soja hispida* oder *Soja max* [Soja-
 35 bohne], Funariaceae wie die Gattungen *Aphanorrhagma*, *Entosthodon*, *Funaria*,
Physcomitrella, *Physcomitrium* z.B. die Gattungen und Arten *Aphanorrhagma serra-*
tum, *Entosthodon attenuatus*, *Entosthodon bolanderi*, *Entosthodon bonplandii*,
Entosthodon californicus, *Entosthodon drummondii*, *Entosthodon jamesonii*, *Entostho-*
don leibergii, *Entosthodon neoscoticus*, *Entosthodon rubrisetus*, *Entosthodon spathuli-*
 40 *folius*, *Entosthodon tucsoni*, *Funaria americana*, *Funaria bolanderi*, *Funaria calcarea*,
Funaria californica, *Funaria calvescens*, *Funaria convoluta*, *Funaria flavicans*, *Funaria*
groutiana, *Funaria hygrometrica*, *Funaria hygrometrica var. arctica*, *Funaria hygro-*
metrica var. calvescens, *Funaria hygrometrica var. convoluta*, *Funaria hygrometrica*
var. muralis, *Funaria hygrometrica var. utahensis*, *Funaria microstoma*, *Funaria*
 45 *microstoma var. obtusifolia*, *Funaria muhlenbergii*, *Funaria orcuttii*, *Funaria plano-*

- convexa, *Funaria polaris*, *Funaria ravenelii*, *Funaria rubriseta*, *Funaria serrata*, *Funaria sonorae*, *Funaria sublimbatus*, *Funaria tucsoni*, *Physcomitrella californica*, *Physcomitrella patens*, *Physcomitrella readeri*, *Physcomitrium australe*, *Physcomitrium californicum*, *Physcomitrium collenchymatum*, *Physcomitrium coloradense*, *Physcomitrium cupuliferum*, *Physcomitrium drummondii*, *Physcomitrium eurystomum*, *Physcomitrium flexifolium*, *Physcomitrium hookeri*, *Physcomitrium hookeri* var. *serratum*, *Physcomitrium immersum*, *Physcomitrium kellermanii*, *Physcomitrium megalocarpum*, *Physcomitrium pyriforme*, *Physcomitrium pyriforme* var. *serratum*, *Physcomitrium rufipes*, *Physcomitrium sandbergii*, *Physcomitrium subsphaericum*, *Physcomitrium washingtoniense*, Geraniaceae wie die Gattungen *Pelargonium*, *Cocos*, Oleum z.B. die Gattungen und Arten *Cocos nucifera*, *Pelargonium grossularioides* oder *Oleum cocois* [Kokosnuss], Gramineae wie die Gattung *Saccharum* z.B. die Gattung und Art *Saccharum officinarum*, Juglandaceae wie die Gattungen *Juglans*, *Wallia* z.B. die Gattungen und Arten *Juglans regia*, *Juglans ailanthifolia*, *Juglans sieboldiana*, *Juglans cinerea*, *Wallia cinerea*, *Juglans bixbyi*, *Juglans californica*, *Juglans hindsii*, *Juglans intermedia*, *Juglans jamaicensis*, *Juglans major*, *Juglans microcarpa*, *Juglans nigra* oder *Wallia nigra* [Walnuss], Lauraceae wie die Gattungen *Persea*, *Laurus* z.B. die Gattungen und Arten *Laurus nobilis* [Lorbeer], *Persea americana*, *Persea gratissima* oder *Persea persea* [Avocado], Leguminosae wie die Gattung *Arachis* z.B. die Gattung und Art *Arachis hypogaea* [Erdnuss], Linaceae wie die Gattungen *Linum*, *Adenolinum* z.B. die Gattungen und Arten *Linum usitatissimum*, *Linum humile*, *Linum austriacum*, *Linum bienne*, *Linum angustifolium*, *Linum catharticum*, *Linum flavum*, *Linum grandiflorum*, *Adenolinum grandiflorum*, *Linum lewisii*, *Linum narbonense*, *Linum perenne*, *Linum perenne* var. *lewisii*, *Linum pratense* oder *Linum trigynum* [Lein], Lythraeae wie die Gattung *Punica* z.B. die Gattung und Art *Punica granatum* [Granatapfel], Malvaceae wie die Gattung *Gossypium* z.B. die Gattungen und Arten *Gossypium hirsutum*, *Gossypium arboreum*, *Gossypium barbadense*, *Gossypium herbaceum* oder *Gossypium thurberi* [Baumwolle], Marchantiaceae wie die Gattung *Marchantia* z.B. die Gattungen und Arten *Marchantia berteroana*, *Marchantia foliacea*, *Marchantia macropora*, Musaceae wie die Gattung *Musa* z.B. die Gattungen und Arten *Musa nana*, *Musa acuminata*, *Musa paradisiaca*, *Musa* spp. [Banane], Onagraceae wie die Gattungen *Camissonia*, *Oenothera* z.B. die Gattungen und Arten *Oenothera biennis* oder *Camissonia brevipes* [Nachtkerze], Palmae wie die Gattung *Elaeis* z.B. die Gattung und Art *Elaeis guineensis* [Ölpalme], Papaveraceae wie die Gattung *Papaver* z.B. die Gattungen und Arten *Papaver orientale*, *Papaver rhoeas*, *Papaver dubium* [Mohn], Pedaliaceae wie die Gattung *Sesamum* z.B. die Gattung und Art *Sesamum indicum* [Sesam], Piperaceae wie die Gattungen *Piper*, *Artanthe*, *Peperomia*, *Steffensia* z.B. die Gattungen und Arten *Piper aduncum*, *Piper amalago*, *Piper angustifolium*, *Piper auritum*, *Piper betel*, *Piper cubeba*, *Piper longum*, *Piper nigrum*, *Piper retrofractum*, *Artanthe adunca*, *Artanthe elongata*, *Peperomia elongata*, *Piper elongatum*, *Steffensia elongata*. [Cayennepfeffer], Poaceae wie die Gattungen *Hordeum*, *Secale*, *Avena*, *Sorghum*, *Andropogon*, *Holcus*, *Panicum*, *Oryza*, *Zea* (Mais), *Triticum* z.B. die Gattungen und Arten *Hordeum vulgare*, *Hordeum jubatum*, *Hordeum murinum*, *Hordeum secalinum*, *Hordeum distichon*, *Hordeum aegiceras*, *Hordeum hexastichon*, *Hordeum hexastichum*, *Hordeum irregulare*, *Hordeum sativum*, *Hordeum secalinum*

- [Gerste], *Secale cereale* [Roggen], *Avena sativa*, *Avena fatua*, *Avena byzantina*, *Avena fatua* var. *sativa*, *Avena hybrida* [Hafer], *Sorghum bicolor*, *Sorghum halepense*, *Sorghum saccharatum*, *Sorghum vulgare*, *Andropogon drummondii*, *Holcus bicolor*, *Holcus sorghum*, *Sorghum aethiopicum*, *Sorghum arundinaceum*, *Sorghum caffrorum*,
5 *Sorghum cernuum*, *Sorghum dochna*, *Sorghum drummondii*, *Sorghum durra*, *Sorghum guineense*, *Sorghum lanceolatum*, *Sorghum nervosum*, *Sorghum saccharatum*,
Sorghum subglabrescens, *Sorghum verticilliflorum*, *Sorghum vulgare*, *Holcus halepensis*, *Sorghum miliaceum*, *Panicum militaceum* [Hirse], *Oryza sativa*, *Oryza latifolia*
10 [Reis], *Zea mays* [Mais] *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum turgidum*, *Triticum hybernum*, *Triticum macha*, *Triticum sativum* oder *Triticum vulgare* [Weizen], Porphyridiaceae wie die Gattungen *Chrootheca*, *Flintiella*, *Petrovanella*, *Porphyridium*, *Rhodel-
la*, *Rhodorus*, *Vanhoeffenia* z.B. die Gattung und Art *Porphyridium cruentum*,
Proteaceae wie die Gattung *Macadamia* z.B. die Gattung und Art *Macadamia intergri-
folia* [Macadamia], Prasinophyceae wie die Gattungen *Nephroselmis*, *Prasinococcus*,
15 *Scherffelia*, *Tetraselmis*, *Mantoniella*, *Ostreococcus* z.B. die Gattungen und Arten
Nephroselmis olivacea, *Prasinococcus capsulatus*, *Scherffelia dubia*, *Tetraselmis chui*,
Tetraselmis suecica, *Mantoniella squamata*, *Ostreococcus tauri*, Rubiaceae wie die
Gattung *Coffea* z.B. die Gattungen und Arten *Coffea* spp., *Coffea arabica*, *Coffea
canephora* oder *Coffea liberica* [Kaffee], Scrophulariaceae wie die Gattung *Verbascum
20 z.B. die Gattungen und Arten* *Verbascum blattaria*, *Verbascum chaixii*, *Verbascum
densiflorum*, *Verbascum lagurus*, *Verbascum longifolium*, *Verbascum lychnitis*,
Verbascum nigrum, *Verbascum olympicum*, *Verbascum phlomoides*, *Verbascum
phoenicum*, *Verbascum pulverulentum* oder *Verbascum thapsus* [Königskerze],
Solanaceae wie die Gattungen *Capsicum*, *Nicotiana*, *Solanum*, *Lycopersicon* z.B. die
25 Gattungen und Arten *Capsicum annuum*, *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*,
Capsicum frutescens [Pfeffer], *Capsicum annuum* [Paprika], *Nicotiana tabacum*,
Nicotiana alata, *Nicotiana attenuata*, *Nicotiana glauca*, *Nicotiana langsdorffii*, *Nicotiana
obtusifolia*, *Nicotiana quadrivalvis*, *Nicotiana repanda*, *Nicotiana rustica*, *Nicotiana
sylvestris* [Tabak], *Solanum tuberosum* [Kartoffel], *Solanum melongena* [Aubergine]
30 *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon lycopersicum*., *Lycopersicon pyriforme*,
Solanum integrifolium oder *Solanum lycopersicum* [Tomate], Sterculiaceae wie die
Gattung *Theobroma* z.B. die Gattung und Art *Theobroma cacao* [Kakao] oder Thea-
ceae wie die Gattung *Camellia* z.B. die Gattung und Art *Camellia sinensis* [Tee].

- Vorteilhafte Mikroorganismen sind beispielweise Pilze ausgewählt aus der Gruppe der
35 Familien Chaetomiaceae, Choanephoraceae, Cryptococcaceae, Cunninghamellaceae,
Dematiaceae, Moniliaceae, Mortierellaceae, Mucoraceae, Pythiaceae, Saccaromyce-
taceae, Saprolegniaceae, Schizosacharomycetaceae, Sodariaceae oder Tubercularia-
ceae.

- Beispielhaft seien die folgenden Mikroorganismen genannt ausgewählt aus der
40 Gruppe: Choanephoraceae wie den Gattungen *Blakeslea*, *Choanephora* z.B. die
Gattungen und Arten *Blakeslea trispora*, *Choanephora cucurbitarum*, *Choanephora
infundibulifera* var. *cucurbitarum*, Mortierellaceae wie der Gattung *Mortierella* z.B. die
Gattungen und Arten *Mortierella isabellina*, *Mortierella polycephala*, *Mortierella*

- ramanniana*, *Mortierella vinacea*, *Mortierella zonata*, Pythiaceae wie den Gattungen *Phytium*, *Phytophthora* z.B. die Gattungen und Arten *Pythium debaryanum*, *Pythium intermedium*, *Pythium irregulare*, *Pythium megalacanthum*, *Pythium paroecandrum*, *Pythium sylvaticum*, *Pythium ultimum*, *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora citricola*, *Phytophthora citrophthora*, *Phytophthora cryptogea*, *Phytophthora drechsleri*, *Phytophthora erythroseptica*, *Phytophthora lateralis*, *Phytophthora megasperma*, *Phytophthora nicotianae*, *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*, *Phytophthora palmivora*, *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora syringae*, Saccharomycetaceae wie den Gattungen *Hansenula*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Yarrowia* z.B. die Gattungen und Arten *Hansenula anomala*, *Hansenula californica*, *Hansenula canadensis*, *Hansenula capsulata*, *Hansenula ciferrii*, *Hansenula glucozyma*, *Hansenula henricii*, *Hansenula holstii*, *Hansenula minuta*, *Hansenula nonfermentans*, *Hansenula philodendri*, *Hansenula polymorpha*, *Hansenula saturnus*, *Hansenula subpelliculosa*, *Hansenula wickerhamii*, *Hansenula wingei*, *Pichia alcoholophila*, *Pichia angusta*, *Pichia anomala*, *Pichia bispora*, *Pichia burtonii*, *Pichia canadensis*, *Pichia capsulata*, *Pichia carsonii*, *Pichia cellobiosa*, *Pichia ciferrii*, *Pichia farinosa*, *Pichia fermentans*, *Pichia finlandica*, *Pichia glucozyma*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia haplophila*, *Pichia henricii*, *Pichia holstii*, *Pichia jadinii*, *Pichia lindnerii*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia methanolica*, *Pichia minuta* var. *minuta*, *Pichia minuta* var. *nonfermentans*, *Pichia norvegensis*, *Pichia ohmeri*, *Pichia pastoris*, *Pichia philodendri*, *Pichia pini*, *Pichia polymorpha*, *Pichia quercuum*, *Pichia rhodanensis*, *Pichia sargentensis*, *Pichia stipitis*, *Pichia strasburgensis*, *Pichia subpelliculosa*, *Pichia toletana*, *Pichia trehalophila*, *Pichia vini*, *Pichia xylosa*, *Saccharomyces acetii*, *Saccharomyces bailii*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces bisporus*, *Saccharomyces capensis*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *Saccharomyces chevalieri*, *Saccharomyces delbrueckii*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces drosophilae*, *Saccharomyces elegans*, *Saccharomyces ellipsoideus*, *Saccharomyces fermentati*, *Saccharomyces florentinus*, *Saccharomyces fragilis*, *Saccharomyces heterogenicus*, *Saccharomyces hienipiensis*, *Saccharomyces inusitatus*, *Saccharomyces italicus*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces krusei*, *Saccharomyces lactis*, *Saccharomyces marxianus*, *Saccharomyces microellipsoides*, *Saccharomyces montanus*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oleaceus*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces pretoriensis*, *Saccharomyces rosei*, *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Yarrowia lipolytica*, Schizosaccharomycetaceae such as the genera *Schizosaccharomyces* e.g. the species *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus*, *Schizosaccharomyces japonicus* var. *versatilis*, *Schizosaccharomyces malidevorans*, *Schizosaccharomyces octosporus*, *Schizosaccharomyces pombe* var. *malidevorans*, *Schizosaccharomyces pombe* var. *pombe*, Thraustochytriaceae such as the genera *Althornia*, *Aplanochytrium*, *Japonochytrium*, *Schizochytrium*, *Thraustochytrium* e.g. the species *Schizochytrium aggregatum*, *Schizochytrium limacinum*, *Schizochytrium mangrovei*, *Schizochytrium minutum*, *Schizochytrium octosporum*, *Thraustochytrium aggregatum*, *Thraustochytrium amoeboides*, *Thraustochytrium antacticum*, *Thraustochytrium arudimentale*, *Thraustochytrium aureum*, *Thraustochytrium benthicola*, *Thraustochytrium globosum*, *Thrausto-*

chytrium indicum, *Thraustochytrium kerguelense*, *Thraustochytrium kinnei*, *Thraustochytrium motivum*, *Thraustochytrium multirudimentale*, *Thraustochytrium pachydermum*, *Thraustochytrium proliferum*, *Thraustochytrium roseum*, *Thraustochytrium rossii*, *Thraustochytrium striatum* oder *Thraustochytrium visurgense*.

- 5 Weitere vorteilhafte Mikroorganismen sind beispielweise Bakterien ausgewählt aus der Gruppe der Familien Bacillaceae, Enterobacteriaceae oder Rhizobiaceae.

- Beispielhaft seien die folgenden Mikroorganismen genannt ausgewählt aus der Gruppe: Bacillaceae wie die Gattung *Bacillus* z.B die Gattungen und Arten *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus amylolyticus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus sphaericus* subsp. *fusiformis*, *Bacillus galactophilus*, *Bacillus globisporus*, *Bacillus globisporus* subsp. *marinus*, *Bacillus halophilus*, *Bacillus lentimorbis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus psychrosaccharolyticus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* oder *Bacillus thuringiensis*; Enterobacteriaceae wie die Gattungen *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella* oder *Serratia* z.B die Gattungen und Arten *Citrobacter amalonaticus*, *Citrobacter diversus*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter genomospecies*, *Citrobacter gillenbergii*, *Citrobacter intermedium*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter murliniae*, *Citrobacter* sp., *Edwardsiella hoshinae*, *Edwardsiella ictaluri*, *Edwardsiella tarda*, *Erwinia alni*, *Erwinia amylovora*, *Erwinia ananatis*, *Erwinia aphidicola*, *Erwinia billingiae*, *Erwinia cacticida*, *Erwinia cancerogena*, *Erwinia carnegieana*, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, *Erwinia carotovora* subsp. *betavasculorum*, *Erwinia carotovora* subsp. *odorifera*, *Erwinia carotovora* subsp. *wasabiae*, *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia cypripedii*, *Erwinia dissolvens*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia mallotivora*, *Erwinia milletiae*, *Erwinia nigrifluens*, *Erwinia nimipressuralis*, *Erwinia persicina*, *Erwinia psidii*, *Erwinia pyriformis*, *Erwinia quercina*, *Erwinia rhapontici*, *Erwinia rubrifaciens*, *Erwinia salicis*, *Erwinia stewartii*, *Erwinia tracheiphila*, *Erwinia uredovora*, *Escherichia adecarboxylata*, *Escherichia anindolica*, *Escherichia aurescens*, *Escherichia blattae*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* var. *communior*, *Escherichia coli*-mutabile, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia* sp., *Escherichia vulneris*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella edwardsii* subsp. *atlantae*, *Klebsiella ornithinolytica*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Klebsiella* sp., *Klebsiella terrigena*, *Klebsiella trevisanii*, *Salmonella abony*, *Salmonella arizonae*, *Salmonella bongori*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *arizonae*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *bongori*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *diarizonae*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *houtenae*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *indica*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *salamae*, *Salmonella daressalaam*, *Salmonella enterica* subsp. *houtenae*, *Salmonella enterica* subsp. *salamae*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella heidelberg*, *Salmonella panama*, *Salmonella senftenberg*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia entomophila*, *Serratia ficaria*, *Serratia fonticola*, *Serratia grimesii*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Serratia marcescens* subsp. *marcescens*,

- Serratia marinorubra*, *Serratia odorifera*, *Serratia plymouthensis*, *Serratia plymuthica*, *Serratia proteamaculans*, *Serratia proteamaculans subsp. quinovora*, *Serratia quinivorans* oder *Serratia rubidaea*; Rhizobiaceae wie die Gattungen *Agrobacterium*, *Carbophilus*, *Chelatobacter*, *Ensifer*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* z.B. die Gattungen und
- 5 Arten *Agrobacterium atlanticum*, *Agrobacterium ferrugineum*, *Agrobacterium gelatinovororum*, *Agrobacterium larrymoorei*, *Agrobacterium meteori*, *Agrobacterium radiobacter*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium rubi*, *Agrobacterium stellulatum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium vitis*, *Carbophilus carboxidus*, *Chelatobacter heintzii*, *Ensifer adhaerens*, *Ensifer arboris*, *Ensifer fredii*, *Ensifer kostiensis*, *Ensifer kummerowiae*, *Ensifer medicae*, *Ensifer meliloti*, *Ensifer sahelii*, *Ensifer terengae*, *Ensifer xinjiangensis*, *Rhizobium ciceri* *Rhizobium etli*, *Rhizobium fredii*, *Rhizobium galegae*, *Rhizobium gallicum*, *Rhizobium giardinii*, *Rhizobium hainanense*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium huautlense*, *Rhizobium indigoferae*, *Rhizobium japonicum*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium loessense*, *Rhizobium loti*, *Rhizobium lupini*, *Rhizobium mediterraneum*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium mongolense*, *Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium radiobacter*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium rubi*, *Rhizobium sullae*, *Rhizobium tianshanense*, *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium tropici*, *Rhizobium undicola*, *Rhizobium vitis*, *Sinorhizobium adhaerens*, *Sinorhizobium arboris*, *Sinorhizobium fredii*, *Sinorhizobium kostiense*, *Sinorhizobium kummerowiae*, *Sinorhizobium medicae*,
- 10 *Sinorhizobium meliloti*, *Sinorhizobium morelense*, *Sinorhizobium sahelii* oder *Sinorhizobium xinjiangense*.

- Weitere vorteilhafte Mikroorganismen für das erfindungsgemäße Verfahren sind beispielweise Protisten oder Diatomeen ausgewählt aus der Gruppe der Familien
- 25 *Dinophyceae*, *Turaniellidae* oder *Oxytrichidae* wie die Gattungen und Arten: *Cryptocodium cohnii*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Stylonychia mytilus*, *Stylonychia pustulata*, *Stylonychia putrina*, *Stylonychia notophora*, *Stylonychia sp.*, *Colpidium campylum* oder *Colpidium sp.*

- Vorteilhaft werden im erfindungsgemäßen Verfahren transgene Organismen wie Pilze wie *Mortierella* oder *Traustochytrium*, Hefen wie *Saccharomyces* oder *Schizosaccharomyces*, Moose wie *Physcomitrella* oder *Ceratodon*, nicht-humane Tiere wie *Caenorhabditis*, Algen wie *Nephroselmis*, *Pseudoscourfielda*, *Prasinococcus*, *Scherffelia*, *Tetraselmis*, *Mantoniella*, *Ostreococcus*, *Cryptocodium* oder *Phaeodactylum* oder Pflanzen wie zweikeimblättrige oder einkeimblättrige Pflanzen verwendet. Besonders vorteilhaft werden Organismen im erfindungsgemäßen Verfahren
- 30 verwendet, die zu den Öl-produzierenden Organismen gehören, das heißt die für die Herstellung von Ölen verwendet werden, wie Pilze wie *Mortierella* oder *Traustochytrium*, Algen wie *Nephroselmis*, *Pseudoscourfielda*, *Prasinococcus*, *Scherffelia*, *Tetraselmis*, *Mantoniella*, *Ostreococcus*, *Cryptocodium*, *Phaeodactylum* oder Pflanzen, insbesondere Pflanzen bevorzugt Ölfruchtpflanzen, die große Mengen
- 35 an Lipidverbindungen enthalten, wie Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, Saflor (*Carthamus tinctoria*), Mohn, Senf, Hanf, Rizinus, Olive, Sesam, Calendula, Punica, Nachtkerze, Königskerze, Distel, Wildrosen, Haselnuss, Mandel, Macadamia, Avocado, Lorbeer, Kürbis, Lein, Soja, Pistazien, Borretsch, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss
- 40

oder Walnuss) oder Feldfrüchte, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Baumwolle, Maniok, Pfeffer, Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Alfalfa oder Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten sowie ausdauernde Gräser und Futterfeldfrüchte. Bevorzugte
 5 erfindungsgemäße Pflanzen sind Ölfruchtpflanzen, wie Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, Saflor, Mohn, Senf, Hanf, Rhizinus, Olive, Calendula, Punica, Nachtkerze, Kürbis, Lein, Soja, Borretsch, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss). Besonders bevorzugt sind C18:2- und/oder C18:3-Fettsäure reiche Pflanzen wie Sonnenblume, Färberdistel, Tabak, Königskerze, Sesam, Baumwolle, Kürbis, Mohn, Nachtkerze,
 10 Walnuss, Lein, Hanf, Distel oder Färberdistel. Ganz besonders bevorzugt sind Pflanzen wie Färberdistel, Sonnenblume, Mohn, Nachtkerze, Walnuss, Lein oder Hanf.

Im Prinzip können alle Gene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels vorteilhaft in Kombination mit der(den) erfinderischen Δ -5-Desaturase(n), Δ -6-Desaturase(n), Δ -4-Desaturase(n) und/oder Δ -12-Desaturase(n) [im Sinne dieser Anmeldung soll der
 15 Plural den Singular und umgekehrt beinhalten] im Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren verwendet werden vorteilhaft werden Gene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen, Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenasen, Lipoxygenasen, Triacylglycerol-Lipasen, Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyasen oder Fettsäure-Elongase(n) in Kombination mit der Δ -5-Desaturase(n), Δ -6-Desaturase(n),
 20 Δ -4-Desaturase(n) und/oder Δ -12-Desaturase(n) verwendet. Besonders bevorzugt werden Gene ausgewählt aus der Gruppe der Δ -4-Desaturasen, Δ -5-Desaturasen, Δ -6-Desaturasen, Δ -9-Desaturasen, Δ -12-Desaturasen, Δ -6-Elongasen oder Δ -5-Elongasen in Kombination mit den vorgenannten Genen für die Δ -5-Desaturase(n), Δ -6-Desaturase(n), Δ -4-Desaturase(n) und/oder Δ -12-Desaturase(n) verwendet, wobei einzelne Gene oder mehrere Gene in Kombination verwendet werden können.

30 Die erfindungsgemäßen Δ -5-Elongasen haben gegenüber den humanen Elongasen die vorteilhafte Eigenschaft, dass sie C_{22} -Fettsäuren nicht zu den entsprechenden C_{24} -Fettsäuren elongieren. Besonders vorteilhafte Δ -5-Elongasen setzen bevorzugt nur ungesättigte C_{20} -Fettsäuren um. Vorteilhaft werden nur C_{20} -Fettsäuren mit einer Doppelbindung in Δ -5-Position umgesetzt, wobei ω -3- C_{20} Fettsäuren bevorzugt werden
 35 (EPA). Weiterhin haben sie in einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung die Eigenschaft, dass sie neben der Δ -5-Elongaseaktivität keine oder nur eine relativ geringe Δ -6-Elongaseaktivität aufweisen. Vorteilhaft setzen sie in einem Hefefütterungstext, in dem als Substrat EPA den Hefen zugesetzt wurde, mindestens 15 Gew.-% des zugesetzten EPAs zu Docosapentaensäure (DPA, $C_{22}:5^{\Delta 7,10,13,16,19}$),
 40 vorteilhaft mindestens 20 Gew.-%, besonders vorteilhaft mindestens 25 Gew.-% um. Wird als Substrat γ -Linolensäure (= GLA, $C_{18}:3^{\Delta 6,9,12}$) gegeben, so wird diese vorteilhaft gar nicht elongiert. Ebenfalls wird auch $C_{18}:3^{\Delta 5,9,12}$ nicht elongiert. In einer anderen vorteilhaften Ausführungsform werden weniger als 60 Gew.-% des zugesetz-

ten GLA zu Dihomo- γ -linolensäure (= C20:3 ^{$\Delta^{8,11,14}$}) umgesetzt, vorteilhaft weniger als 55 Gew.-%, bevorzugt weniger als 50 Gew.-%, besonders vorteilhaft weniger als 45 Gew.-%, ganz besonders vorteilhaft weniger als 40 Gew.-%. In einer weiteren ganz bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Δ -5-Elongaseaktivität wird GLA nicht umgesetzt.

- Die erfindungsgemäßen Δ -4-Desaturasen, Δ -5-Desaturasen und Δ -6-Desaturasen haben gegenüber den bekannten Δ -4-Desaturasen, Δ -5-Desaturasen und Δ -6-Desaturasen den Vorteil, dass sie Fettsäuren gebunden an Phospholipide oder CoA-Fettsäureester, vorteilhaft CoA-Fettsäureester umsetzen können.
- 10 Vorteilhaft setzen die erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Δ -12-Desaturasen Ölsaure (C18:1 ^{Δ^9}) zu Linolsäure (C18:2 ^{$\Delta^{9,12}$}) oder C18:2 ^{$\Delta^{6,9}$} zu C18:3 ^{$\Delta^{6,9,12}$} (= GLA) um. den Vorteilhaft setzen die verwendeten Δ -12-Desaturasen Fettsäuren gebunden an Phospholipide oder CoA-Fettsäureester, vorteilhaft gebunden an CoA-Fettsäureester um.
- 15 Vorteilhaft setzen die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Desaturasen ihre jeweiligen Substrate in Form der CoA-Fettsäureester um. Dies führt, wenn vorher ein Elongationsschritt stattgefunden hat, vorteilhaft zu einer erhöhten Produktausbeute. Die jeweiligen Desaturierungsprodukte werden dadurch in höheren Mengen synthetisiert, da der Elongationsschritt in der Regel an den CoA-Fettsäureestern erfolgt,
- 20 während der Desaturierungsschritt überwiegend an den Phospholipiden oder an den Triglyceriden erfolgt. Eine Austauschreaktion, die eine weitere möglicherweise limitierende Enzymreaktion erforderlich machen würde, zwischen den CoA-Fettsäureestern und den Phospholipiden oder Triglyceriden ist somit nicht erforderlich.
- Durch die enzymatische Aktivität der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten
- 25 Nukleinsäuren, die für Polypeptide mit Δ -5-Desaturase-, Δ -6-Desaturase-, Δ -4-Desaturase-, Δ -12-Desaturase-, Δ -5-Elongase- und/oder Δ -6-Elongase-aktivität codieren, vorteilhaft in Kombination mit Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels wie weiteren Polypeptiden mit Δ -4-, Δ -5-, Δ -6-, Δ -12-Desaturase- oder Δ -5- oder Δ -6-Elongaseaktivität codieren, können unterschiedlichste mehrfach ungesättigte Fettsäuren im erfindungsgemäßen Verfahren
- 30 hergestellt werden. Je nach Auswahl der für das erfindungsgemäße Verfahren verwendeten Organismen wie den vorteilhaften Pflanze lassen sich Mischungen der verschiedenen mehrfach ungesättigten Fettsäuren oder einzelne mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie EPA oder ARA in freier oder gebundener Form herstellen. Je
- 35 nachdem welche Fettsäurezusammensetzung in der Ausgangspflanze vorherrscht (C18:2- oder C18:3-Fettsäuren) entstehen so Fettsäuren, die sich von C18:2-Fettsäuren ableiten, wie GLA, DGLA oder ARA oder, die sich von C18:3-Fettsäuren ableiten, wie SDA, ETA oder EPA. Liegt in der für das Verfahren verwendeten Pflanze als ungesättigte Fettsäure nur Linolsäure (= LA, C18:2 ^{$\Delta^{9,12}$}) vor, so können als Produk-
- 40 te des Verfahrens nur GLA, DGLA und ARA entstehen, die als freie Fettsäuren oder gebunden vorliegen können. Ist in der im Verfahren verwendeten Pflanze als ungesät-

tigte Fettsäure nur α -Linolensäure (= ALA, C18:3^{Δ9,12,15}) beispielsweise wie in Lein, so können als Produkte des Verfahrens nur SDA, ETA, EPA und/oder DHA entstehen, die wie oben beschrieben als freie Fettsäuren oder gebunden vorliegen können. Durch Modifikation der Aktivität der an der Synthese beteiligten Enzyme Δ -5-Desaturase, Δ -6-Desaturase, Δ -4-Desaturase, Δ -12-Desaturase, Δ -5-Elongase und/oder Δ -6-Elongase lassen sich gezielt in den vorgenannten Organismen vorteilhaft in den vorgenannten Pflanzen nur einzelne Produkte herstellen. Durch die Aktivität der Δ -6-Desaturase und Δ -6-Elongase entstehen beispielsweise GLA und DGLA bzw. SDA und ETA, je nach Ausgangspflanze und ungesättigter Fettsäure. Bevorzugt entstehen DGLA bzw. ETA oder deren Mischungen. Werden die Δ -5-Desaturase, die Δ -5-Elongase und die Δ -4-Desaturase zusätzlich in die Organismen vorteilhaft in die Pflanze eingebracht, so entstehen zusätzlich ARA, EPA und/oder DHA. Vorteilhaft werden nur ARA, EPA oder DHA oder deren Mischungen synthetisiert, abhängig von der in im Organismus bzw. in der Pflanze vorliegenden Fettsäure, die als Ausgangssubstanz für die Synthese dient. Da es sich um Biosyntheseketten handelt, liegen die jeweiligen Endprodukte nicht als Reinsubstanzen in den Organismen vor. Es sind immer auch geringe Mengen der Vorläuferverbindungen im Endprodukt enthalten. Diese geringen Mengen betragen weniger als 20 Gew.-%, vorteilhaft weniger als 15 Gew.-%, besonders vorteilhaft weniger als 10 Gew.-%, ganz besonders vorteilhaft weniger als 5, 4, 3, 2 oder 1 Gew.-% bezogen auf das Endprodukt DGLA, ETA oder deren Mischungen bzw. ARA, EPA, DHA oder deren Mischungen vorteilhaft EPA oder DHA oder deren Mischungen.

Neben der Produktion der Ausgangsfettsäuren für die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Δ -5-Desaturase, Δ -6-Desaturase, Δ -4-Desaturase, Δ -12-Desaturase, Δ -5-Elongase und/oder Δ -6-Elongase direkt im Organismus können die Fettsäuren auch von außen gefüttert werden. Aus kostengründen ist die Produktion im Organismus bevorzugt. Bevorzugte Substrate sind die Linolsäure (C18:2^{Δ9,12}), die γ -Linolensäure (C18:3^{Δ6,9,12}), die Eicosadiensäure (C20:2^{Δ11,14}), die Dihomo- γ -linolensäure (C20:3^{Δ8,11,14}), die Arachidonsäure (C20:4^{Δ5,8,11,14}), die Docosatetraensäure (C22:4^{Δ7,10,13,16}) und die Docosapentaensäure (C22:5^{Δ4,7,10,13,15}).

Zur Steigerung der Ausbeute im beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Ölen und/oder Triglyceriden mit einem vorteilhaft erhöhten Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren ist es vorteilhaft die Menge an Ausgangsprodukt für die Fettsäuresynthese zu steigern, dies kann beispielsweise durch das Einbringen einer Nukleinsäure in den Organismus, die für ein Polypeptid mit Δ -12-Desaturase codiert, erreicht werden. Dies ist besonders vorteilhaft in Öl-produzierenden Organismen wie der Familie der Brassicaceae wie der Gattung Brassica z.B. Raps; der Familie der Elaeagnaceae wie die Gattung Elaeagnus z.B. die Gattung und Art *Olea europaea* oder der Familie Fabaceae wie der Gattung Glycine z.B. die Gattung und Art *Glycine max*, die einen hohen Ölsäuregehalt aufweisen. Da diese Organismen nur einen geringen Gehalt an Linolsäure aufweisen (Mikoklajczak et al., Journal of the American Oil Chemical Society, 38, 1961, 678 - 681) ist die Verwendung der genannten Δ -12-Desaturasen zur Herstellung des Ausgangsprodukts Linolsäure vorteilhaft.

Im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren stammen vorteilhaft aus Pflanzen wie Algen beispielsweise Algen der Familie der Prasinophyceae wie aus den Gattungen *Heteromastix*, *Mammella*, *Mantoniella*, *Micromonas*, *Nephroselmis*, *Ostreococcus*, *Prasinocladus*, *Prasinococcus*, *Pseudoscourfielda*, *Pycnococcus*,
 5 *Pyramimonas*, *Scherffelia* oder *Tetraselmis* wie den Gattungen und Arten *Heteromastix longifillis*, *Mamiella gilva*, *Mantoniella squamata*, *Micromonas pusilla*, *Nephroselmis olivacea*, *Nephroselmis pyriformis*, *Nephroselmis rotunda*, *Ostreococcus tauri*, *Ostreococcus* sp. *Prasinocladus ascus*, *Prasinocladus lubricus*, *Pycnococcus provasolii*,
 10 *Pyramimonas amyliifera*, *Pyramimonas disomata*, *Pyramimonas obovata*, *Pyramimonas orientalis*, *Pyramimonas parkeae*, *Pyramimonas spinifera*, *Pyramimonas* sp., *Tetraselmis apiculata*, *Tetraselmis carteriaformis*, *Tetraselmis chui*, *Tetraselmis convolutae*, *Tetraselmis desikacharyi*, *Tetraselmis gracilis*, *Tetraselmis hazeni*, *Tetraselmis impellucida*, *Tetraselmis inconspicua*, *Tetraselmis levis*, *Tetraselmis maculata*,
 15 *Tetraselmis marina*, *Tetraselmis striata*, *Tetraselmis subcordiformis*, *Tetraselmis suecica*, *Tetraselmis tetrabrachia*, *Tetraselmis tetrathele*, *Tetraselmis verrucosa*, *Tetraselmis verrucosa* fo. *Rubens* oder *Tetraselmis* sp. Vorteilhaft stammen die verwendeten Nukleinsäuren aus Algen der Gattungen *Mantonielle* oder *Ostreococcus*.

Weitere vorteilhafte Pflanzen sind Algen wie *Isochrysis* oder *Crypthecodinium*, Algen/Diatomeen wie *Thalassiosira*, *Phaeodactylum* oder *Thraustochytrium*, Moose wie
 20 *Physcomitrella* oder *Ceratodon* oder höheren Pflanzen wie den *Primulaceae* wie *Aleuritia*, *Calendula stellata*, *Osteospermum spinescens* oder *Osteospermum hyoseroides*, Mikroorganismen wie Pilzen wie *Aspergillus*, *Thraustochytrium*, *Phytophthora*, *Entomophthora*, *Mucor* oder *Mortierella*, Bakterien wie *Shewanella*, Hefen oder Tieren wie Nematoden wie *Caenorhabditis*, Insekten oder Fischen. Vorteilhaft stammen die
 25 erfindungsgemäßen isolierten Nukleinsäuresequenzen aus einem Tier aus der Ordnung der Vertebraten. Bevorzugt stammen die Nukleinsäuresequenzen aus der Klasse der Vertebrata; *Euteleostomi*, *Actinopterygii*; *Neopterygii*; *Teleostei*; *Euteleostei*, *Protacanthopterygii*, *Salmoniformes*; *Salmonidae* bzw. *Oncorhynchus*. Besonders vorteilhaft stammen die Nukleinsäuren aus Pilzen, Tieren oder aus Pflanzen wie Algen
 30 oder Moosen, bevorzugt aus der Ordnung der *Salmoniformes* wie der Familie der *Salmonidae* wie der Gattung *Salmo* beispielsweise aus den Gattungen und Arten *Oncorhynchus mykiss*, *Trutta trutta* oder *Salmo trutta fario*, aus Algen wie den Gattungen *Mantonielle* oder *Ostreococcus* oder aus den Diatomeen wie den Gattungen *Thalassiosira* oder *Crypthecodinium*.

35 Vorteilhaft werden im erfindungsgemäßen Verfahren die vorgenannten Nukleinsäuresequenzen oder deren Derivat oder Homologe, die für Polypeptide codieren, die noch die enzymatische Aktivität der durch Nukleinsäuresequenzen codierten Proteine besitzen. Diese Sequenzen werden einzeln oder in Kombination mit den für die Δ -12-Desaturase, Δ -4-Desaturase, Δ -5-Desaturase, Δ -6-Desaturase, Δ -5-Elongase und/oder
 40 Δ -6-Elongase codierenden Nukleinsäuresequenzen in Expressionskonstrukte cloniert und zum Einbringen und zur Expression in Organismen verwendet. Diese Expressions-

konstrukte ermöglichen durch ihre Konstruktion eine vorteilhafte optimale Synthese der im erfindungsgemäßen Verfahren produzierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren.

- Bei einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Verfahren ferner den Schritt des Gewinnens einer Zelle oder eines ganzen Organismus, der die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen enthält, wobei die Zelle und/oder der Organismus mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz, die für die Δ -12-Desaturase, Δ -4-Desaturase, Δ -5-Desaturase, Δ -6-Desaturase, Δ -5-Elongase und/oder Δ -6-Elongase codiert, einem Genkonstrukt oder einem Vektor wie nachfolgend beschrieben, allein oder in Kombination mit weiteren Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine des Fettsäure- oder Lipidsstoffwechsels codieren, transformiert wird. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst dieses Verfahren ferner den Schritt des Gewinnens der Öle, Lipide oder freien Fettsäuren aus dem Organismus oder aus der Kultur. Bei der Kultur kann es sich beispielsweise um eine Fermentationskultur beispielsweise im Falle der Kultivierung von Mikroorganismen wie z.B. *Mortierella*, *Thalassiosira*, *Mantoniella*, *Ostreococcus*, *Saccharomyces* oder *Thraustochytrium* oder um eine Treibhaus oder Feldkultur einer Pflanze handeln. Die so hergestellte Zelle oder der so hergestellte Organismus ist vorteilhaft eine Zelle eines Öl-produzierenden Organismus wie einer Ölfruchtpflanze wie beispielsweise Erdnuss, Raps, Canola, Lein, Hanf, Erdnuss, Soja, Safflower, Hanf, Sonnenblumen oder Borretsch.
- Unter Anzucht ist beispielsweise die Kultivierung im Falle von Pflanzenzellen, -gewebe oder -organe auf oder in einem Nährmedium oder der ganzen Pflanze auf bzw. in einem Substrat beispielsweise in Hydrokultur, Blumentopferde oder auf einem Ackerboden zu verstehen.
- "Transgen" bzw. "Rekombinant" im Sinne der Erfindung bedeutet bezüglich zum Beispiel einer Nukleinsäuresequenz, einer Expressionskassette (= Genkonstrukt) oder einem Vektor enthaltend die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder einem Organismus transformiert mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, Expressionskassette oder Vektor alle solche durch gentechnische Methoden zustande gekommenen Konstruktionen, in denen sich entweder
- die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, oder
 - eine mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpfte genetische Kontrollsequenz, zum Beispiel ein Promotor, oder
 - (a) und (b)
- sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielhaft eine Substitution, Addition, Deletion, Inversion oder Insertion eines oder mehrerer Nucleotide sein kann. Natürliche genetische Umgebung meint den natürlichen genomischen bzw. chromosomalen Locus in dem Herkunftsorganismus oder das Vorliegen in einer genomischen Bibliothek. Im Fall einer genomischen Bibliothek ist die natürliche,

genetische Umgebung der Nukleinsäuresequenz bevorzugt zumindest noch teilweise erhalten. Die Umgebung flankiert die Nukleinsäuresequenz zumindest an einer Seite und hat eine Sequenzlänge von mindestens 50 bp, bevorzugt mindestens 500 bp, besonders bevorzugt mindestens 1000 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 5000 bp. Eine natürlich vorkommende Expressionskassette - beispielsweise die natürlich vorkommende Kombination des natürlichen Promotors der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen mit den entsprechenden Δ -12-Desaturase-, Δ -4-Desaturase-, Δ -5-Desaturase-, Δ -6-Desaturase- und/oder Δ -5-Elongasegenen - wird zu einer transgenen Expressionskassette, wenn diese durch nicht-natürliche, synthetische ("künstliche") Verfahren wie beispielsweise einer Mutagenisierung geändert wird. Entsprechende Verfahren sind beispielsweise beschrieben in US 5,565,350 oder WO 00/15815.

Unter transgenen Organismus bzw. transgener Pflanze im Sinne der Erfindung ist wie vorgenannt zu verstehen, dass die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren nicht an ihrer natürlichen Stelle im Genom eines Organismus sind, dabei können die Nukleinsäuren homolog oder heterolog exprimiert werden. Transgen bedeutet aber auch wie genannt, dass die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren an ihrem natürlichen Platz im Genom eines Organismus sind, dass jedoch die Sequenz gegenüber der natürlichen Sequenz verändert wurde und/oder dass die Regulationssequenzen, der natürlichen Sequenzen verändert wurden. Bevorzugt ist unter transgen die Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren an nicht natürlicher Stelle im Genom zu verstehen, das heißt eine homologe oder bevorzugt heterologe Expression der Nukleinsäuren liegt vor. Bevorzugte transgene Organismen sind Pilze wie *Mortierella* oder *Phytophthora*, Moose wie *Physcomitrella*, Algen wie *Mantoniella* oder *Ostreococcus*, Diatomeen wie *Thalassiosira* oder *Cryptocodinium* oder Pflanzen wie die Ölfuchtpflanzen.

Als Organismen bzw. Wirtsorganismen für die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die Expressionskassette oder den Vektor eignen sich prinzipiell vorteilhaft alle Organismen, die in der Lage sind Fettsäuren speziell ungesättigte Fettsäuren zu synthetisieren bzw. für die Expression rekombinanter Gene geeignet sind. Beispielhaft seien Pflanzen wie *Arabidopsis*, *Asteraceae* wie *Calendula* oder Kulturpflanzen wie Soja, Erdnuss, Rizinus, Sonnenblume, Mais, Baumwolle, Flachs, Raps, Kokosnuss, Ölpalme, FärberSaflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne, Mikroorganismen wie Pilze beispielsweise die Gattung *Mortierella*, *Thraustochytrium*, *Saprolegnia*, *Phytophthora* oder *Pythium*, Bakterien wie die Gattung *Escherichia* oder *Shewanella*, Hefen wie die Gattung *Saccharomyces*, Cyanobakterien, Ciliaten, Algen wie *Mantoniella* oder *Ostreococcus* oder Protozoen wie Dinoflagellaten wie *Thalassiosira* oder *Cryptocodinium* genannt. Bevorzugt werden Organismen, die natürlicherweise Öle in größeren Mengen synthetisieren können wie Pilze wie *Mortierella alpina*, *Pythium insidiosum*, *Phytophthora infestans* oder Pflanzen wie Soja, Raps, Kokosnuss, Ölpalme, FärberSaflor, Flachs, Hanf, Rizinus, *Calendula*, Erdnuss, Kakaobohne oder Sonnenblume oder Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae*, besonders bevorzugt werden Soja, Flachs, Raps, FärberSaflor, Sonnenblume, *Calendula*, *Mortierella* oder *Saccharomyces cerevisiae*. Prinzipiell sind als Wirtsorganismen neben

den vorgenannten transgenen Organismen auch transgene Tiere vorteilhaft nicht-humane Tiere geeignet beispielsweise *C. elegans*.

Nutzbare Wirtszellen sind weiterhin genannt in: Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).

- 5 Verwendbare Expressionsstämme z.B. solche, die eine geringere Proteaseaktivität aufweisen sind beschrieben in: Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128.

- 10 Hierzu gehören Pflanzenzellen und bestimmte Gewebe, Organe und Teile von Pflanzen in all ihren Erscheinungsformen, wie Antheren, Fasern, Wurzelhaare, Stängel, Embryos, Kalli, Kotelydonen, Petiolen, Erntematerial, pflanzliches Gewebe, reproduktives Gewebe und Zellkulturen, das von der eigentlichen transgenen Pflanze abgeleitet ist und/oder dazu verwendet werden kann, die transgene Pflanze hervor-zubringen.

- 15 Transgene Pflanzen, die die im erfindungsgemäßen Verfahren synthetisierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren enthalten, können vorteilhaft direkt vermarktet werden ohne dass die synthetisierten Öle, Lipide oder Fettsäuren isoliert werden müssen. Unter Pflanzen im erfindungsgemäßen Verfahren sind ganze Pflanzen sowie alle Pflanzenteile, Pflanzenorgane oder Pflanzenteile wie Blatt, Stiel, Samen, Wurzel, Knollen, Antheren, Fasern, Wurzelhaare, Stängel, Embryos, Kalli, Kotelydonen, 20 Petiolen, Erntematerial, pflanzliches Gewebe, reproduktives Gewebe, Zellkulturen, die sich von der transgenen Pflanze abgeleiten und/oder dazu verwendet werden können, die transgene Pflanze hervorzubringen. Der Samen umfasst dabei alle Samenteile wie die Samenhüllen, Epidermis- und Samenzellen, Endosperm oder Embryogewebe. Die im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Verbindungen können aber auch aus 25 den Organismen vorteilhaft Pflanzen in Form ihrer Öle, Fett, Lipide und/oder freien Fettsäuren isoliert werden. Durch dieses Verfahren hergestellte mehrfach ungesättigten Fettsäuren lassen sich durch Ernten der Organismen entweder aus der Kultur, in der sie wachsen, oder vom Feld ernten. Dies kann über Pressen oder Extraktion der Pflanzenteile bevorzugt der Pflanzensamen erfolgen. Dabei können die Öle, Fette, 30 Lipide und/oder freien Fettsäuren durch sogenanntes kalt schlagen oder kalt pressen ohne Zuführung von Wärme durch Pressen gewonnen werden. Damit sich die Pflanzenteile speziell die Samen leichter aufschließen lassen, werden sie vorher zerkleinert, gedämpft oder geröstet. Die so vorbehandelten Samen können anschließend gepresst werden oder mit Lösungsmittel wie warmen Hexan extrahiert werden. Anschließend 35 wird das Lösungsmittel wieder entfernt. Im Falle von Mikroorganismen werden diese nach Ernte beispielsweise direkt ohne weitere Arbeitsschritte extrahiert oder aber nach Aufschluss über verschiedene dem Fachmann bekannte Methoden extrahiert. Auf diese Weise können mehr als 96 % der im Verfahren hergestellten Verbindungen isoliert werden. Anschließend werden die so erhaltenen Produkte weiter bearbeitet, 40 das heißt raffiniert. Dabei werden zunächst beispielsweise die Pflanzenschleime und Trübstoffe entfernt. Die sogenannte Entschleimung kann enzymatisch oder beispiels-

weise chemisch/physikalisch durch Zugabe von Säure wie Phosphorsäure erfolgen. Anschließend werden die freien Fettsäuren durch Behandlung mit einer Base beispielsweise Natronlauge entfernt. Das erhaltene Produkt wird zur Entfernung der im Produkt verbliebenen Lauge mit Wasser gründlich gewaschen und getrocknet. Um die
 5 noch im Produkt enthaltenen Farbstoffe zu entfernen werden die Produkte einer Bleichung mit beispielsweise Bleicherde oder Aktivkohle unterzogen. Zum Schluss wird das Produkt noch beispielsweise mit Wasserdampf noch desodoriert.

Vorzugsweise sind die durch dieses Verfahren produzierten PUFAs bzw. LCPUFAs C_{18} -, C_{20} - oder C_{22} -Fettsäuremoleküle vorteilhaft C_{20} - oder C_{22} -Fettsäuremoleküle mit
 10 mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen. Diese C_{18} -, C_{20} - oder C_{22} -Fettsäuremoleküle lassen sich aus dem Organismus in Form eines Öls, Lipids oder einer freien Fettsäure isolieren. Geeignete Organismen sind beispielsweise die vorstehend erwähnten. Bevorzugte Organismen sind transgene Pflanzen.

15 Eine Ausführungsform der Erfindung sind deshalb Öle, Lipide oder Fettsäuren oder Fraktionen davon, die durch das oben beschriebene Verfahren hergestellt worden sind, besonders bevorzugt Öl, Lipid oder eine Fettsäurezusammensetzung, die PUFAs umfassen und von transgenen Pflanzen herrühren.

20 Diese Öle, Lipide oder Fettsäuren enthalten wie oben beschrieben vorteilhaft 6 bis 15 % Palmitinsäure, 1 bis 6 % Stearinsäure; 7 – 85 % Ölsäure; 0,5 bis 8 % Vaccensäure, 0,1 bis 1 % Arachinsäure, 7 bis 25 % gesättigte Fettsäuren, 8 bis 85 % einfach ungesättigte Fettsäuren und 60 bis 85 % mehrfach ungesättigte Fettsäuren jeweils bezogen auf 100 % und auf den Gesamtfettsäuregehalt der Organismen. Als vorteilhafte mehrfach ungesättigte Fettsäure sind in den Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische
 25 bevorzugt mindestens 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 oder 1 % bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt an Arachidonsäure enthalten. Weiterhin enthalten die Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden, vorteilhaft Fettsäuren ausgewählt aus der Gruppe der Fettsäuren Erucasäure (13-Docosaensäure), Sterculinsäure (9,10-Methylene octadec-9-
 30 enonsäure), Malvalinsäure (8,9-Methylen Heptadec-8-enonsäure), Chaulmoogrinsäure (Cyclopenten-dodecansäure), Furan-Fettsäure (9,12-Epoxy-octadeca-9,11-dienonsäure), Vernonsäure (9,10-Epoxyoctadec-12-enonsäure), Tarinsäure (6-Octadecynonsäure), 6-Nonadecynonsäure, Santalbinsäure (t11-Octadecen-9-ynoic acid), 6,9-Octadecenynonsäure, Pyrulinsäure (t10-Heptadecen-8-ynonsäure), Crepe-
 35 nyninsäure (9-Octadecen-12-ynonsäure), 13,14-Dihydrooropheinsäure, Octadecen-13-ene-9,11-diyonsäure, Petroselensäure (cis-6-Octadecenonsäure), 9c,12t-Octadecadiensäure, Calendulasäure (8t10t12c-Octadecatriensäure), Catalpinsäure (9t11t13c-Octadecatriensäure), Eleosterinsäure (9c11t13t-Octadecatriensäure), Jacarinsäure (8c10t12c-Octadecatriensäure), Punicinsäure (9c11t13c-Octadecatrien-
 40 säure), Parinarinsäure (9c11t13t15c-Octadecatetraensäure), Pinolensäure (all-cis-5,9,12-Octadecatriensäure), Laballensäure (5,6-Octadecadienallensäure), Ricinolsäure (12-Hydroxyölsäure) und/oder Coriolinsäure (13-Hydroxy-9c,11t-Octadecadienon-

säure). Die vorgenannten Fettsäuren kommen in den nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Fettsäureester bzw. Fettsäuregemischen in der Regel vorteilhaft nur in Spuren vor, das heißt sie kommen bezogen auf die Gesamtfettsäuren zu weniger als 30 %, bevorzugt zu weniger als 25 %, 24 %, 23 %, 22 % oder 21 %, besonders bevorzugt zu weniger als 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 % oder 5 %, ganz besonders bevorzugt zu weniger als 4 %, 3 %, 2 % oder 1 % vor. Vorteilhaft enthalten die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische weniger als 0,1 % bezogen auf die Gesamtfettsäuren oder keine Butterbuttersäure, kein Cholesterin, keine Clupanodonsäure (= Docosapentaensäure, C22:5^{Δ4,8,12,15,21}) sowie keine Nisinsäure (Tetracosahexaensäure, C23:6^{Δ3,8,12,15,18,21}).

Vorteilhaft enthalten die erfindungsgemäßen Öle, Lipide oder Fettsäuren mindestens 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4% oder 5%, vorteilhaft mindestens 6%, 7%, 8%, 9% oder 10%, besonders vorteilhaft mindestens 11%, 12%, 13%, 14% oder 15% ARA oder mindestens 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4% oder 5%, vorteilhaft mindestens 6%, oder 7%, besonders vorteilhaft mindestens 8%, 9% oder 10% EPA und/oder DHA bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt des Produktionsorganismus vorteilhaft einer Pflanze, besonders vorteilhaft einer Ölfruchtpflanze wie Soja, Raps, Kokosnuss, Ölpalme, Färbersafflor, Flachs, Hanf, Rizinus, Calendula, Erdnuss, Kakaobohne, Sonnenblume oder den oben genannten weiteren ein- oder zweikeimblättrigen Ölfruchtpflanzen.

Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform ist die Verwendung des Öls, Lipids, der Fettsäuren und/oder der Fettsäurezusammensetzung in Futtermitteln, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika. Die erfindungsgemäßen Öle, Lipide, Fettsäuren oder Fettsäuregemische können in der dem Fachmann bekannten Weise zur Abmischung mit anderen Ölen, Lipiden, Fettsäuren oder Fettsäuregemischen tierischen Ursprungs wie z.B. Fischölen verwendet werden. Auch diese Öle, Lipide, Fettsäuren oder Fettsäuregemische, die aus pflanzlichen und tierischen Bestandteilen bestehen, können zur Herstellung von Futtermitteln, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika verwendet werden.

Unter dem Begriff "Öl", "Lipid" oder "Fett" wird ein Fettsäuregemisch verstanden, das ungesättigte, gesättigte, vorzugsweise veresterte Fettsäure(n) enthält. Bevorzugt ist, dass das Öl, Lipid oder Fett einen hohen Anteil an mehrfach ungesättigten freien oder vorteilhaft veresterten Fettsäure(n), insbesondere Linolsäure, γ -Linolensäure, Dihomo- γ -linolensäure, Arachidonsäure, α -Linolensäure, Stearidonsäure, Eicosatetraensäure, Eicosapentaensäure, Docosapentaensäure oder Docosahexaensäure hat. Vorzugsweise ist der Anteil an ungesättigten veresterten Fettsäuren ungefähr 30 %, mehr bevorzugt ist ein Anteil von 50 %, noch mehr bevorzugt ist ein Anteil von 60 %, 70 %, 80 % oder mehr. Zur Bestimmung kann z.B. der Anteil an Fettsäure nach Überführung der Fettsäuren in die Methylester durch Umesterung gaschromatographisch bestimmt werden. Das Öl, Lipid oder Fett kann verschiedene andere gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren, z.B. Calendulasäure, Palmitin-, Palmitolein-, Stearin-, Ölsäure etc.,

enthalten. Insbesondere kann je nach Ausgangsorganismus der Anteil der verschiedenen Fettsäuren in dem Öl oder Fett schwanken.

Bei den im Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit vorteilhaft mindestens zwei Doppelbindungen enthalten, handelt es sich wie oben beschrieben
5 beispielsweise um Sphingolipide, Phosphoglyceride, Lipide, Glycolipide, Phospholipide, Monoacylglycerin, Diacylglycerin, Triacylglycerin oder sonstige Fettsäureester.

Aus den so im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit vorteilhaft mindestens fünf oder sechs Doppelbindungen lassen sich die enthaltenden mehrfach ungesättigten Fettsäuren beispielsweise über eine Alkali-
10 behandlung beispielsweise wäßrige KOH oder NaOH oder saure Hydrolyse vorteilhaft in Gegenwart eines Alkohols wie Methanol oder Ethanol oder über eine enzymatische Abspaltung freisetzen und isolieren über beispielsweise Phasentrennung und anschließender Ansäuerung über z.B. H₂SO₄. Die Freisetzung der Fettsäuren kann auch direkt ohne die vorhergehend beschriebene Aufarbeitung erfolgen.

Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren können nach Einbringung in einem Organismus vorteilhaft einer Pflanzenzelle bzw. Pflanze entweder auf einem separaten Plasmid liegen oder vorteilhaft in das Genom der Wirtszelle integriert sein. Bei Integration in das Genom kann die Integration zufallsgemäß sein oder durch derartige Rekombination erfolgen, dass das native Gen durch die eingebrachte Kopie ersetzt
20 wird, wodurch die Produktion der gewünschten Verbindung durch die Zelle moduliert wird, oder durch Verwendung eines Gens in trans, so dass das Gen mit einer funktionellen Expressionseinheit, welche mindestens eine die Expression eines Gens gewährleistende Sequenz und mindestens eine die Polyadenylierung eines funktionell transkribierten Gens gewährleistende Sequenz enthält, funktionell verbunden ist.
25 Vorteilhaft werden die Nukleinsäuren über Multiexpressionskassetten oder Konstrukte zur multiparallelen Expression in die Organismen vorteilhaft zur multiparallelen samenspezifischen Expression von Genen in die Pflanzen gebracht.

Moose und Algen sind die einzigen bekannten Pflanzensysteme, die erhebliche Mengen an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wie Arachidonsäure (ARA) und/oder
30 Eicosapentaensäure (EPA) und/oder Docosahexaensäure (DHA) herstellen. Moose enthalten PUFAs in Membranlipiden während Algen, algenverwandte Organismen und einige Pilze auch nennenswerte Mengen an PUFAs in der Triacylglycerolfraktion akkumulieren. Daher eignen sich Nukleinsäuremoleküle, die aus solchen Stämmen isoliert werden, die PUFAs auch in der Triacylglycerolfraktion akkumulieren, besonders
35 vorteilhaft für das erfindungsgemäße Verfahren und damit zur Modifikation des Lipid- und PUFA-Produktionssystems in einem Wirt, insbesondere Pflanzen, wie Ölfruchtpflanzen, beispielsweise Raps, Canola, Lein, Hanf, Soja, Sonnenblumen, Borretsch. Sie sind deshalb vorteilhaft im erfindungsgemäßen Verfahren verwendbar.

Als Substrate der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die
40 für Polypeptide mit Δ -12-Desaturase-, Δ -5-Desaturase-, Δ -4-Desaturase-, Δ -6-Desaturase-, Δ -5-Elongase- und/oder Δ -6-Elongase-Aktivität codieren, und/oder den

weiteren verwendeten Nukleinsäuren wie den Nukleinsäuren, die für Polypeptide des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenase(n), Lipoxygenase(n), Triacylglycerol-Lipase(n), Allenoxid-Synthase(n), Hydroperoxid-Lyase(n) oder Fettsäure-Elongase(n) codieren eignen sich vorteilhaft C₁₆-, C₁₈- oder C₂₀-Fettsäuren. Bevorzugt werden die im Verfahren als Substrate umgesetzten Fettsäuren in Form ihrer Acyl-CoA-Ester und/oder ihrer Phospholipid-Ester umgesetzt.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen langkettigen PUFAs müssen die mehrfach ungesättigten C₁₈-Fettsäuren zunächst durch die enzymatische Aktivität einer Desaturase zunächst desaturiert und anschließend über eine Elongase um mindestens zwei Kohlenstoffatome verlängert werden. Nach einer Elongationsrunde führt diese Enzymaktivität zu C₂₀-Fettsäuren, und nach zwei Elongationsrunden zu C₂₂-Fettsäuren. Die Aktivität der erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Desaturasen und Elongasen führt vorzugsweise zu C₁₈-, C₂₀- und/oder C₂₂-Fettsäuren vorteilhaft mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise mit drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen, besonders bevorzugt zu C₂₀- und/oder C₂₂-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise mit drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen, ganz besonders bevorzugt mit fünf oder sechs Doppelbindungen im Molekül. Nachdem eine erste Desaturierung und die Verlängerung stattgefunden hat, können weitere Desaturierungs- und Elongierungsschritte wie z.B. eine solche Desaturierung in Δ -5- und Δ -4-Position erfolgen. Besonders bevorzugt als Produkte des erfindungsgemäßen Verfahrens sind Dihomo- γ -linolensäure, Arachidonsäure, Eicosapentaensäure, Docosapentaensäure und/oder Docosahexaensäure. Die C₂₀-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure können durch die erfindungsgemäße enzymatische Aktivität in Form der freien Fettsäure oder in Form der Ester, wie Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide, Phosphoglyceride, Monoacylglycerin, Diacylglycerin oder Triacylglycerin, verlängert werden.

Der bevorzugte Biosyntheseort von Fettsäuren, Ölen, Lipiden oder Fette in den vorteilhaft verwendeten Pflanzen ist beispielsweise im allgemeinen der Samen oder Zellschichten des Samens, so dass eine samenspezifische Expression der im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, dass die Biosynthese von Fettsäuren, Ölen oder Lipiden nicht auf das Samengewebe beschränkt sein muss, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze - beispielsweise in Epidermiszellen oder in den Knollen - gewebespezifisch erfolgen kann.

Werden im erfindungsgemäßen Verfahren als Organismen Mikroorganismus wie Hefen wie *Saccharomyces* oder *Schizosaccharomyces*, Pilze wie *Mortierella*, *Aspergillus*, *Phytophthora*, *Entomophthora*, *Mucor* oder *Thraustochytrium* Algen wie *Isochrysis*,

Mantoniella, Ostreococcus, Phaeodactylum oder Crypthecodinium verwendet, so werden diese Organismen vorteilhaft fermentativ angezogen.

5 Durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, die für eine Δ -5-Elongase codieren, können im Verfahren die hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mindestens um 5 %, bevorzugt mindestens um 10 %, besonders bevorzugt mindestens um 20 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 50 % gegenüber dem Wildtyp der Organismen, die die Nukleinsäuren nicht rekombinant enthalten, erhöht werden.

10 Durch das erfindungsgemäße Verfahren können die hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den im Verfahren verwendeten Organismen prinzipiell auf zwei Arten erhöht werden. Es kann vorteilhaft der Pool an freien mehrfach ungesättigten Fettsäuren und/oder der Anteil der über das Verfahren hergestellten veresterten mehrfach ungesättigten Fettsäuren erhöht werden. Vorteilhaft wird durch das erfindungsgemäße Verfahren der Pool an veresterten mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den
15 transgenen Organismen erhöht.

Werden im erfindungsgemäßen Verfahren als Organismen Mikroorganismen verwendet, so werden sie je nach Wirtsorganismus in dem Fachmann bekannter Weise angezogen bzw. gezüchtet. Mikroorganismen werden in der Regel in einem flüssigen Medium, das eine Kohlenstoffquelle meist in Form von Zuckern, eine Stickstoffquelle
20 meist in Form von organischen Stickstoffquellen wie Hefeextrakt oder Salzen wie Ammoniumsulfat, Spurenelemente wie Eisen-, Mangan-, Magnesiumsalze und gegebenenfalls Vitamine enthält, bei Temperaturen zwischen 0°C und 100°C, bevorzugt zwischen 10°C bis 60°C unter Sauerstoffbegasung angezogen. Dabei kann der pH der Nährflüssigkeit auf einen festen Wert gehalten werden, das heißt während der
25 Anzucht reguliert werden oder nicht. Die Anzucht kann batch wise, semi batch wise oder kontinuierlich erfolgen. Nährstoffe können zu Beginn der Fermentation vorgelegt oder semikontinuierlich oder kontinuierlich nachgefüttert werden. Die hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren können nach dem Fachmann bekannten Verfahren wie oben beschrieben aus den Organismen isoliert werden. Beispielsweise über
30 Extraktion, Destillation, Kristallisation, ggf. Salzfällung und/oder Chromatographie. Die Organismen können dazu vorher noch vorteilhaft aufgeschlossen werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird, wenn es sich bei den Wirtsorganismen um Mikroorganismen handelt, vorteilhaft bei einer Temperatur zwischen 0°C bis 95° ,
35 bevorzugt zwischen 10°C bis 85°C, besonders bevorzugt zwischen 15°C bis 75°C, ganz besonders bevorzugt zwischen 15°C bis 45°C durchgeführt.

Der pH-Wert wird dabei vorteilhaft zwischen pH 4 und 12, bevorzugt zwischen pH 6 und 9, besonders bevorzugt zwischen pH 7 und 8 gehalten.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann batchweise, semi-batchweise oder kontinuierlich betrieben werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden
40 ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrens-

technik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bio-reaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) zu finden.

5 Das zu verwendende Kulturmedium hat in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme zu genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods für General Bacteriology" der American Society für Bacteriology (Washington D. C., USA, 1981) enthalten.

10 Diese erfindungsgemäß einsetzbaren Medien umfassen wie oben beschrieben gewöhnlich eine oder mehrere Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen, anorganische Salze, Vitamine und/oder Spurenelemente.

15 Bevorzugte Kohlenstoffquellen sind Zucker, wie Mono-, Di- oder Polysaccharide. Sehr gute Kohlenstoffquellen sind beispielsweise Glucose, Fructose, Mannose, Galactose, Ribose, Sorbose, Ribulose, Lactose, Maltose, Saccharose, Raffinose, Stärke oder Cellulose. Man kann Zucker auch über komplexe Verbindungen, wie Melassen, oder
20 andere Nebenprodukte der Zucker-Raffinierung zu den Medien geben. Es kann auch vorteilhaft sein, Gemische verschiedener Kohlenstoffquellen zuzugeben. Andere mögliche Kohlenstoffquellen sind Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und/oder Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und/oder Linolsäure, Alkohole und/oder Polyalkohole wie z. B. Glycerin, Methanol
25 und/oder Ethanol und/oder organische Säuren wie z.B. Essigsäure und/oder Milchsäure.

Stickstoffquellen sind gewöhnlich organische oder anorganische Stickstoffverbindungen oder Materialien, die diese Verbindungen enthalten. Beispielhafte Stickstoffquellen umfassen Ammoniak in flüssiger- oder gasform oder Ammoniumsalze, wie
30 Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat oder Ammoniumnitrat, Nitrate, Harnstoff, Aminosäuren oder komplexe Stickstoffquellen, wie Maisquellwasser, Sojamehl, Sojaprotein, Hefeextrakt, Fleischextrakt und andere. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

35 Anorganische Salzverbindungen, die in den Medien enthalten sein können, umfassen die Chlorid-, Phosphor- oder Sulfatsalze von Calcium, Magnesium, Natrium, Kobalt, Molybdän, Kalium, Mangan, Zink, Kupfer und Eisen.

Als Schwefelquelle für die Herstellung von schwefelhaltigen Feinchemikalien, insbesondere von Methionin, können anorganische schwefelhaltige Verbindungen wie beispielsweise Sulfate, Sulfite, Dithionite, Tetrathionate, Thiosulfate, Sulfide aber auch
40 organische Schwefelverbindungen, wie Mercaptane und Thiole, verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden.

Chelatbildner können zum Medium gegeben werden, um die Metallionen in Lösung zu halten. Besonders geeignete Chelatbildner umfassen Dihydroxyphenole, wie Catechol oder Protocatechuat, oder organische Säuren, wie Citronensäure.

Die erfindungsgemäß zur Kultivierung von Mikroorganismen eingesetzten Fermentationsmedien enthalten üblicherweise auch andere Wachstumsfaktoren, wie Vitamine oder Wachstumsförderer, zu denen beispielsweise Biotin, Riboflavin, Thiamin, Folsäure, Nikotinsäure, Panthothenat und Pyridoxin gehören. Wachstumsfaktoren und Salze stammen häufig von komplexen Medienkomponenten, wie Hefeextrakt, Melassen, Maisquellwasser und dergleichen. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genaue Zusammensetzung der Medienverbindungen hängt stark vom jeweiligen Experiment ab und wird für jeden spezifischen Fall individuell entschieden. Information über die Medienoptimierung ist erhältlich aus dem Lehrbuch "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach" (Hrsg. P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press (1997) S. 53-73, ISBN 0 19 963577 3). Wachstumsmedien lassen sich auch von kommerziellen Anbietern beziehen, wie Standard 1 (Merck) oder BHI (Brain heart infusion, DIFCO) und dergleichen.

Sämtliche Medienkomponenten werden, entweder durch Hitze (20 min bei 1,5 bar und 121°C) oder durch Sterilfiltration, sterilisiert. Die Komponenten können entweder zusammen oder nötigenfalls getrennt sterilisiert werden. Sämtliche Medienkomponenten können zu Beginn der Anzucht zugegen sein oder wahlfrei kontinuierlich oder chargenweise hinzugegeben werden.

Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise zwischen 15°C und 45°C, vorzugsweise bei 25°C bis 40°C und kann während des Experimentes konstant gehalten oder verändert werden. Der pH-Wert des Mediums sollte im Bereich von 5 bis 8,5, vorzugsweise um 7,0 liegen. Der pH-Wert für die Anzucht lässt sich während der Anzucht durch Zugabe von basischen Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder sauren Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure kontrollieren. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z. B. Fettsäurepolyglykolester, eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe, wie z. B. Antibiotika, hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen, wie z.B. Umgebungsluft, in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die so erhaltenen, insbesondere mehrfach ungesättigte Fettsäuren enthaltenden, Fermentationsbrühen haben üblicherweise eine Trockenmasse von 7,5 bis 25 Gew.-%.

Die Fermentationsbrühe kann anschließend weiterverarbeitet werden. Je nach Anforderung kann die Biomasse ganz oder teilweise durch Separationsmethoden, wie z. B. Zentrifugation, Filtration, Dekantieren oder einer Kombination dieser Methoden

aus der Fermentationsbrühe entfernt oder vollständig in ihr belassen werden. Vorteilhaft wird die Biomasse nach Abtrennung aufgearbeitet.

Die Fermentationsbrühe kann aber auch ohne Zellabtrennung mit bekannten Methoden, wie z. B. mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, Dünnschichtverdampfers, 5 Fallfilmverdampfers, durch Umkehrosiose, oder durch Nanofiltration, eingedickt beziehungsweise aufkonzentriert werden. Diese aufkonzentrierte Fermentationsbrühe kann schließlich zur Gewinnung der darin enthaltenen Fettsäuren aufgearbeitet werden.

Die im Verfahren gewonnenen Fettsäuren eignen sich auch als Ausgangsmaterial für 10 die chemische Synthese von weiteren Wertprodukten. Sie können beispielsweise in Kombination miteinander oder allein zur Herstellung von Pharmaka, Nahrungsmittel, Tierfutter oder Kosmetika verwendet werden.

Ein weiterer Erfindungsgegenstand sind isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit Δ -6-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:

- 15 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 13 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 14 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- 20 c) Derivate der in SEQ ID NO: 13 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 14 codieren und eine Δ -6-Desaturaseaktivität aufweisen.

Ein weiterer Erfindungsgegenstand sind isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit Δ -5-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:

- 25 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 9 oder in SEQ ID NO: 11 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 10 oder in SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- 30 c) Derivate der in SEQ ID NO: 9 oder in SEQ ID NO: 11 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 10 oder in SEQ ID NO: 12 codieren und eine Δ -5-Desaturaseaktivität aufweisen.

Ein weiterer Erfindungsgegenstand sind isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit Δ -4-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 7 dargestellten Sequenz,
 - 5 b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 8 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
 - c) Derivate der in SEQ ID NO: 7 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 8 codieren und eine Δ -4-Desaturaseaktivität aufweisen.
- 10 Ein weiterer Erfindungsgegenstand sind isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit Δ -12-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:
- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 15 dargestellten Sequenz,
 - b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 16 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
 - 15 c) Derivate der in SEQ ID NO: 15 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 50 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 16 codieren und eine Δ -12-Desaturaseaktivität aufweisen.

Ein weiterer Erfindungsgegenstand sind Genkonstrukte, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 oder SEQ ID NO: 15 enthalten, wobei die Nukleinsäure funktionsfähig mit einem oder mehreren Regulationssignalen verbunden ist. Zusätzlich können weitere Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels enthält ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), 25 Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylasen, Lipoxygenasen, Triacylglycerol-Lipasen, Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyase(n) oder Fettsäure-Elongase(n) im Genkonstrukt enthalten sein. Vorteilhaft sind zusätzlich Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe der Δ -4-Desaturase, Δ -5-Desaturase, Δ -6-Desaturase, Δ -9-Desaturase, Δ -12-Desaturase oder Δ -6-Elongase enthalten.

Vorteilhaft stammen alle die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen aus einem eukaryontischen Organismus wie einer Pflanze, einem 35 Mikroorganismus oder einem Tier. Bevorzugt stammen die Nukleinsäuresequenzen aus der Ordnung Salmoniformes, Algen wie Mantoniella oder Ostreococcus, Pilzen wie

der Gattung Phytophthora oder von Diatomeen wie den Gattungen Thalassiosira oder Cryptocodinium.

Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine mit Δ -4-Desaturase-, Δ -5-Desaturase-, Δ -6-Desaturase-, Δ -9-Desaturase-, Δ -12-Desaturase-, Δ -5-Elongase- oder Δ -6-Elongase-Aktivität codieren, werden vorteilhaft allein oder bevorzugt in Kombination in einer Expressionskassette (= Nukleinsäurekonstrukt), die die Expression der Nukleinsäuren in einem Organismus vorteilhaft einer Pflanze oder einem Mikroorganismus ermöglicht, eingebracht. Es kann im Nukleinsäurekonstrukt mehr als eine Nukleinsäuresequenz einer enzymatischen Aktivität wie z.B. einer Δ -12-Desaturase, Δ -4-Desaturase, Δ -5-Desaturase, Δ -6-Desaturase, Δ -5-Elongase und/oder Δ -6-Elongase enthalten sein.

Zum Einbringen werden die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren vorteilhaft einer Amplifikation und Ligation in bekannter Weise unterworfen. Vorzugsweise geht man in Anlehnung an das Protokoll der Pfu-DNA-Polymerase oder eines Pfu/Taq-DNA-Polymerasegemisches vor. Die Primer werden in Anlehnung an die zu amplifizierende Sequenz gewählt. Zweckmäßigerweise sollten die Primer so gewählt werden, dass das Amplifikat die gesamte kodogene Sequenz vom Start- bis zum Stop-Kodon umfasst. Im Anschluss an die Amplifikation wird das Amplifikat zweckmäßigerweise analysiert. Beispielsweise kann die Analyse nach gelelektrophoretischer Auftrennung hinsichtlich Qualität und Quantität erfolgen. Im Anschluss kann das Amplifikat nach einem Standardprotokoll gereinigt werden (z.B. Qiagen). Ein Aliquot des gereinigten Amplifikats steht dann für die nachfolgende Klonierung zur Verfügung. Geeignete Klonierungsvektoren sind dem Fachmann allgemein bekannt. Hierzu gehören insbesondere Vektoren, die in mikrobiellen Systemen replizierbar sind, also vor allem Vektoren, die eine effiziente Klonierung in Hefen oder Pilze gewährleisten, und die stabile Transformation von Pflanzen ermöglichen. Zu nennen sind insbesondere verschiedene für die T-DNA-vermittelte Transformation geeignete, binäre und co-integrierte Vektorsysteme. Derartige Vektorsysteme sind in der Regel dadurch gekennzeichnet, dass sie zumindest die für die Agrobacterium-vermittelte Transformation benötigten vir-Gene sowie die T-DNA begrenzenden Sequenzen (T-DNA-Border) beinhalten. Vorzugsweise umfassen diese Vektorsysteme auch weitere cis-regulatorische Regionen wie Promotoren und Terminatoren und/oder Selektionsmarker, mit denen entsprechend transformierte Organismen identifiziert werden können. Während bei co-integrierten Vektorsystemen vir-Gene und T-DNA-Sequenzen auf demselben Vektor angeordnet sind, basieren binäre Systeme auf wenigstens zwei Vektoren, von denen einer vir-Gene, aber keine T-DNA und ein zweiter T-DNA, jedoch kein vir-Gen trägt. Dadurch sind letztere Vektoren relativ klein, leicht zu manipulieren und sowohl in E.-coli als auch in Agrobacterium zu replizieren. Zu diesen binären Vektoren gehören Vektoren der Serien pBIB-HYG, pPZP, pBecks, pGreen. Erfindungsgemäß bevorzugt verwendet werden Bin19, pBI101, pBinAR, pGPTV und pCAMBIA. Eine Übersicht über binäre Vektoren und ihre Verwendung gibt Hellens et al, Trends in Plant Science (2000) 5, 446–451. Für die Vektorpräparation können die Vektoren zunächst mit Restriktionsendonuklease(n) linearisiert und dann in geeigneter Weise enzymatisch modifiziert

werden. Im Anschluss wird der Vektor gereinigt und ein Aliquot für die Klonierung eingesetzt. Bei der Klonierung wird das enzymatisch geschnittenen und erforderlichenfalls gereinigten Amplifikat mit ähnlich präparierten Vektorfragmenten mit Einsatz von Ligase kloniert. Dabei kann ein bestimmtes Nukleinsäurekonstrukt bzw. Vektor- oder Plasmidkonstrukt einen oder auch mehrere kodogene Genabschnitte aufweisen. Vorzugsweise sind die kodogenen Genabschnitte in diesen Konstrukten mit regulatorischen Sequenzen funktional verknüpft. Zu den regulatorischen Sequenzen gehören insbesondere pflanzliche Sequenzen wie die oben beschriebenen Promotoren und Terminatoren. Die Konstrukte lassen sich vorteilhafterweise in Mikroorganismen, insbesondere *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens*, unter selektiven Bedingungen stabil propagieren und ermöglichen einen Transfer von heterologer DNA in Pflanzen oder Mikroorganismen.

Unter der vorteilhaften Verwendung von Klonierungsvektoren können die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die erfinderischen Nukleinsäuren und Nukleinsäurekonstrukte in Organismen wie Mikroorganismen oder vorteilhaft Pflanzen eingebracht werden und damit bei der Pflanzentransformation verwendet werden, wie denjenigen, die veröffentlicht sind in und dort zitiert sind: *Plant Molecular Biology and Biotechnology* (CRC Press, Boca Raton, Florida), Kapitel 6/7, S. 71-119 (1993); F.F. White, *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants*; in: *Transgenic Plants*, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, 15-38; B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, in: *Transgenic Plants*, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143; Potrykus, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991), 205-225). Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die erfinderischen Nukleinsäuren und Nukleinsäurekonstrukte und/oder Vektoren lassen sich damit zur gentechnologischen Veränderung eines breiten Spektrums an Organismen vorteilhaft an Pflanzen verwenden, so dass diese bessere und/oder effizientere Produzenten von PUFAs werden.

Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch die eine Veränderung des erfindungsgemäßen Δ -12-Desaturase-, Δ -5-Elongase-, Δ -6-Elongase-, Δ -5-Desaturase-, Δ -4-Desaturase- und/oder Δ -6-Desaturase-Proteins sowie der weiteren im Verfahren verwendeten Proteine wie die Δ -12-Desaturase-, Δ -6-Desaturase-, Δ -6-Elongase-, Δ -5-Desaturase- oder Δ -4-Desaturase-Proteine möglich ist, so dass die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion der vorteilhaft mehrfach ungesättigten Fettsäuren in einer Pflanze bevorzugt in einer Ölfruchtpflanze oder einem Mikroorganismus aufgrund dieses veränderten Proteins direkt beeinflusst werden kann. Die Anzahl oder Aktivität der Δ -12-Desaturase-, Δ -6-Desaturase-, Δ -6-Elongase-, Δ -5-Desaturase-, Δ -5-Elongase- oder Δ -4-Desaturase-Proteine oder -Gene kann erhöht werden, so dass größere Mengen der Genprodukte und damit letztlich größere Mengen der Verbindungen der allgemeinen Formel I hergestellt werden. Auch eine de novo Synthese in einem Organismus, dem die Aktivität und Fähigkeit zur Biosynthese der Verbindungen vor dem Einbringen des/der entsprechenden Gens/Gene fehlte, ist möglich. Entsprechendes gilt für die Kombination mit weiteren Desaturasen oder Elongasen oder weiteren Enzymen aus dem Fettsäure- und Lipidstoffwechsel. Auch die Verwendung

verschiedener divergenter, d.h. auf DNA-Sequenzebene unterschiedlicher Sequenzen kann dabei vorteilhaft sein bzw. die Verwendung von Promotoren zur Genexpression, die eine andere zeitliche Genexpression z.B. abhängig vom Reifegrad eines Samens oder Öl-speichernden Gewebes ermöglicht.

- 5 Durch das Einbringen eines Δ -12-Desaturase-, Δ -6-Desaturase-, Δ -6-Elongase-, Δ -5-Desaturase-, Δ -5-Elongase- und/oder Δ -4-Desaturase-Genes in einen Organismus allein oder in Kombination mit anderen Genen in eine Zelle kann nicht nur den Biosynthesefluss zum Endprodukt erhöht, sondern auch die entsprechende Triacylglycerin-Zusammensetzung erhöht oder de novo geschaffen werden. Ebenso kann
10 die Anzahl oder Aktivität anderer Gene, die am Import von Nährstoffen, die zur Biosynthese einer oder mehrerer Fettsäuren, Ölen, polaren und/oder neutralen Lipiden nötig sind, erhöht sein, so dass die Konzentration dieser Vorläufer, Cofaktoren oder Zwischenverbindungen innerhalb der Zellen oder innerhalb des Speicherkompartiments erhöht ist, wodurch die Fähigkeit der Zellen zur Produktion von PUFAs, wie
15 im folgenden beschrieben, weiter gesteigert wird. Durch Optimierung der Aktivität oder Erhöhung der Anzahl einer oder mehrerer Δ -12-Desaturase-, Δ -6-Desaturase-, Δ -6-Elongase-, Δ -5-Desaturase-, Δ -5-Elongase- oder Δ -4-Desaturase-Gene, die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind, oder durch Zerstören der Aktivität einer oder mehrerer Gene, die am Abbau dieser Verbindungen beteiligt sind, kann es
20 möglich sein, die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von Fettsäure- und Lipidmolekülen aus Organismen und vorteilhaft aus Pflanzen zu steigern.

- Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten isolierten Nukleinsäuremoleküle codieren für Proteine oder Teile von diesen, wobei die Proteine oder das einzelne Protein oder Teile davon eine Aminosäuresequenz enthält, die ausreichend homolog
25 zu einer Aminosäuresequenz ist, die in den Sequenzen SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 oder SEQ ID NO: 16 dargestellt ist, so dass die Proteine oder Teile davon noch eine Δ -12-Desaturase-, Δ -6-Desaturase-, Δ -6-Elongase-, Δ -5-Desaturase-, Δ -5-Elongase- oder Δ -4-Desaturase-Aktivität aufweisen. Vorzugsweise haben die Proteine oder Teile
30 davon, die von dem Nukleinsäuremolekül/den Nukleinsäuremolekülen kodiert wird/werden, noch seine wesentliche enzymatische Aktivität und die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen oder Lipidkörperchen in Organismen vorteilhaft in Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilzunehmen. Vorteilhaft sind die von den Nukleinsäuremolekülen kodierten Proteine zu mindestens etwa 40 %, vorzugsweise mindestens etwa 50% oder 60 % und stärker bevorzugt mindestens etwa 70 %, 80 % oder 90 % und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr identisch zu den in
40 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 oder SEQ ID NO: 16 dargestellten Aminosäuresequenzen. Im Sinne der Erfindung ist unter Homologie oder homolog, Identität oder identisch zu verstehen.

Die Homologie wurde über den gesamten Aminosäure- bzw. Nukleinsäuresequenzbereich berechnet. Für das Vergleichen verschiedener Sequenzen stehen dem Fachmann eine Reihe von Programmen, die auf verschiedenen Algorithmen beruhen zur Verfügung. Dabei liefern die Algorithmen von Needleman und Wunsch oder Smith und Waterman besonders zuverlässige Ergebnisse. Für die Sequenzvergleiche wurde das Programm PileUp verwendet (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151-153) oder die Programme Gap und BestFit [Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443-453 (1970) und Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2; 482-489 (1981))], die im GCG Software-Paket [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991)] enthalten sind. Die oben in Prozent angegebenen Sequenzhomologiewerte wurden mit dem Programm GAP über den gesamten Sequenzbereich mit folgenden Einstellungen ermittelt: Gap Weight: 50, Length Weight: 3, Average Match: 10.000 und Average Mismatch: 0.000. Diese Einstellungen wurden, falls nicht anders angegeben, immer als Standardeinstellungen für Sequenzvergleiche verwendet wurden.

Unter wesentlicher enzymatischer Aktivität der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Δ -12-Desaturase-, Δ -6-Desaturase, Δ -6-Elongase, Δ -5-Desaturase, Δ -5-Elongase oder Δ -4-Desaturase ist zu verstehen, dass sie gegenüber den durch die Sequenz mit SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 oder SEQ ID NO: 15 und deren Derivate codierten Proteinen/Enzymen im Vergleich noch mindestens eine enzymatische Aktivität von mindestens 10 %, bevorzugt 20 %, besonders bevorzugt 30 % und ganz besonders 40 % aufweisen und damit am Stoffwechsel von zum Aufbau von Fettsäuren, Fettsäureester wie Diacylglyceride und/oder Triacylglyceride in einem Organismus vorteilhaft einer Pflanze oder Pflanzenzelle notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über Membranen teilnehmen können, wobei C_{18} -, C_{20} - oder C_{22} -Kohlenstoffketten im Fettsäuremolekül mit Doppelbindungen an mindestens zwei, vorteilhaft drei, vier, fünf oder sechs Stellen gemeint sind.

Vorteilhaft im Verfahren verwendbare Nukleinsäuren stammen aus Bakterien, Pilzen, Diatomeen, Tieren wie Caenorhabditis oder Oncorhynchus oder Pflanzen wie Algen oder Moosen wie den Gattungen Shewanella, Physcomitrella, Thraustochytrium, Fusarium, Phytophthora, Ceratodon, Mantoniella, Ostreococcus, Isochrysis, Aleurita, Muscarioides, Mortierella, Borago, Phaeodactylum, Cryptocodinium, speziell aus den Gattungen und Arten Oncorhynchus mykiss, Thalassiosira pseudonona, Mantoniella squamata, Ostreococcus sp., Ostreococcus tauri, Euglena gracilis, Physcomitrella patens, Phytophthora infestans, Fusarium gramineum, Cryptocodinium cohnii, Ceratodon purpureus, Isochrysis galbana, Aleurita farinosa, Thraustochytrium sp., Muscarioides vialii, Mortierella alpina, Borago officinalis, Phaeodactylum tricornutum, Caenorhabditis elegans oder besonders vorteilhaft aus Oncorhynchus mykiss, Thalassiosira pseudonona oder Cryptocodinium cohnii.

Alternativ können im erfindungsgemäßen Verfahren Nukleotidsequenzen verwendet werden, die für eine Δ -12-Desaturase, Δ -6-Desaturase, Δ -6-Elongase, Δ -5-Desaturase,

Δ -5-Elongase oder Δ -4-Desaturase codieren und die an eine Nukleotidsequenz, wie in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 oder SEQ ID NO: 15 dargestellt, vorteilhaft unter stringenten Bedingungen hybridisieren.

- 5 Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen werden vorteilhaft in einer Expressionskassette, die die Expression der Nukleinsäuren in Organismen wie Mikroorganismen oder Pflanzen ermöglicht, eingebracht.

10 Dabei werden die Nukleinsäuresequenzen, die für die Δ -12-Desaturase, Δ -6-Desaturase, Δ -6-Elongase, Δ -5-Desaturase, Δ -5-Elongase oder Δ -4-Desaturase codieren, mit einem oder mehreren Regulationssignalen vorteilhafterweise zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft. Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert und/oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird. Beispielsweise handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen um Sequenzen an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen oder anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so dass die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Die Expressionskassette (= Expressionskonstrukt = Genkonstrukt) kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es wurden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die Nukleinsäuresequenz oder dessen Derivate inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Stattdessen wurde die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und/oder die Genexpression gesteigert wird. Diese veränderten Promotoren können in Form von Teilsequenzen (= Promotor mit Teilen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen) auch allein vor das natürliche Gen zur Steigerung der Aktivität gebracht werden. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die Δ -12-Desaturase-, Δ -4-Desaturase-, Δ 5-Desaturase-, Δ -6-Desaturase-, Δ -5-Elongase- und/oder Δ -6-Elongase-Gene können in einer oder mehreren Kopien in der Expressionskassette (= Genkonstrukt) enthalten sein. Vorteilhaft liegt nur jeweils eine Kopie der Gene in der Expressionskassette vor. Dieses Genkonstrukt oder die Genkonstrukte können zusammen im Wirtsorganismus exprimiert werden. Dabei kann das Genkonstrukt oder die Genkonstrukte in einem - oder mehreren Vektoren inseriert sein und frei in der Zelle vorliegen oder aber im Genom inseriert sein. Es ist vorteilhaft für die Insertion weiterer Gene im Wirtsgenom, wenn die zu exprimierenden Gene zusammen in einem Genkonstrukt vorliegen.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei wie oben beschrieben vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhaft-
er Weise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie
5 Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine
Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA
verbessert wird.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung sind ein oder mehrere Genkonstrukte, die
eine oder mehrere Sequenzen enthalten, die durch SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ
10 ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 oder SEQ ID
NO: 15 oder dessen Derivate definiert sind und für Polypeptide gemäß SEQ ID NO: 2,
SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID
15 NO: 14 oder SEQ ID NO: 16 kodieren. Die genannten Δ -12-Desaturase-, Δ -6-
Desaturase-, Δ -6-Elongase-, Δ -5-Desaturase-, Δ -5-Elongase- oder Δ -4-Desaturase-
Proteine führen dabei vorteilhaft zu einer Desaturierung oder Elongierung von Fettsäu-
ren, wobei das Substrat vorteilhaft ein, zwei, drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindun-
gen aufweist und vorteilhaft 18, 20 oder 22 Kohlenstoffatome im Fettsäuremolekül
aufweist. Gleiches gilt für ihre Homologen, Derivate oder Analoga, die funktionsfähig
mit einem oder mehreren Regulationssignalen, vorteilhafterweise zur Steigerung der
20 Genexpression, verbunden sind.

Vorteilhafte Regulationssequenzen für das neue Verfahren liegen beispielsweise in
Promotoren vor, wie dem *cos*-, *tac*-, *trp*-, *tet*-, *trp-tet*-, *lpp*-, *lac*-, *lpp-lac*-, *lacIq*-, *T7*-
, *T5*-, *T3*-, *gal*-, *trc*-, *ara*-, *SP6*-, λ -PR- oder λ -PL-Promotor und werden vorteilhaft-
er Weise in Gram-negativen Bakterien angewendet. Weitere vorteilhafte Regulations-
25 sequenzen liegen beispielsweise in den Gram-positiven Promotoren *amy* und *SPO2*,
in den Hefe- oder Pilzpromotoren *ADC1*, *MF α* , *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH*, *TEF*, *rp28*,
ADH oder in den Pflanzenpromotoren *CaMV/35S* [Franck et al., *Cell* 21 (1980) 285-
294], *PRP1* [Ward et al., *Plant. Mol. Biol.* 22 (1993)], *SSU*, *OCS*, *lib4*, *usp*, *STLS1*,
B33, *nos* oder im Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor vor. In diesem Zusammenhang
30 vorteilhaft sind ebenfalls induzierbare Promotoren, wie die in EP-A-0 388 186
(Benzylsulfonamid-induzierbar), *Plant J.* 2, 1992:397-404 (Gatz et al., Tetracyclin-
induzierbar), EP-A-0 335 528 (Abzisisäure-induzierbar) oder WO 93/21334 (Ethanol-
oder Cyclohexenol-induzierbar) beschriebenen Promotoren. Weitere geeignete
Pflanzenpromotoren sind der Promotor von cytosolischer *FBPase* oder der *ST-LSI*-
35 Promotor der Kartoffel (Stockhaus et al., *EMBO J.* 8, 1989, 2445), der Phosphoribosyl-
pyrophosphatamidotransferase-Promotor aus *Glycine max* (Genbank-Zugangsnr.
U87999) oder der in EP-A-0 249 676 beschriebene nodienspezifische Promotor.
Besonders vorteilhafte Promotoren sind Promotoren, welche die Expression in Ge-
weben ermöglichen, die an der Fettsäurebiosynthese beteiligt sind. Ganz besonders
40 vorteilhaft sind samenspezifische Promotoren, wie der ausführungsgemäße *USP*
Promotor aber auch andere Promotoren wie der *LeB4*-, *DC3*, *Phaseolin*- oder *Napin*-
Promotor. Weitere besonders vorteilhafte Promotoren sind samenspezifische Promo-
toren, die für monokotyle oder dikotyle Pflanzen verwendet werden können und

in US 5,608,152 (Napin-Promotor aus Raps), WO 98/45461 (Oleosin-Promotor aus *Arabidopsis*), US 5,504,200 (Phaseolin-Promotor aus *Phaseolus vulgaris*), WO 91/13980 (Bce4-Promotor aus *Brassica*), von Baumlein et al., *Plant J.*, 2, 2, 1992:233–239 (LeB4-Promotor aus einer Leguminose) beschrieben sind, wobei sich
5 diese Promotoren für Dikotyledonen eignen. Die folgenden Promotoren eignen sich beispielsweise für Monokotyledonen lpt–2– oder lpt–1–Promotor aus Gerste (WO 95/15389 und WO 95/23230), Hordein-Promotor aus Gerste und andere, in WO 99/16890 beschriebene geeignete Promotoren.

Es ist im Prinzip möglich, alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen,
10 wie die oben genannten, für das neue Verfahren zu verwenden. Es ist ebenfalls möglich und vorteilhaft, zusätzlich oder alleine synthetische Promotoren zu verwenden, besonders wenn sie eine Samen-spezifische Expression vermitteln, wie z.B. beschrieben in WO 99/16890.

Um einen besonders hohen Gehalt an PUFAs vor allem in transgenen Pflanzen zu
15 erzielen, sollten die PUFA-Biosynthesegene vorteilhaft samenspezifisch in Ölsaaten exprimiert werden. Hierzu können Samen-spezifische Promotoren verwendet werden, bzw. solche Promotoren die im Embryo und/oder im Endosperm aktiv sind. Samen-spezifische Promotoren können prinzipiell sowohl aus dikotyledonen als auch aus monokotyledonen Pflanzen isoliert werden. Im folgenden sind vorteilhafte bevorzugte
20 Promotoren aufgeführt: USP (= unknown seed protein) und Vicilin (*Vicia faba*) [Baumlein et al., *Mol. Gen. Genet.*, 1991, 225(3)], Napin (Raps) [US 5,608,152], Acyl-Carrier Protein (Raps) [US 5,315,001 und WO 92/18634], Oleosin (*Arabidopsis thaliana*) [WO 98/45461 und WO 93/20216], Phaseolin (*Phaseolus vulgaris*) [US 5,504,200], Bce4 [WO 91/13980], Leguminosen B4 (LegB4-Promotor) [Baumlein et al., *Plant J.*,
25 2,2, 1992], Lpt2 und Lpt1(Gerste) [WO 95/15389 u. WO95/23230], Samen-spezifische Promotoren aus Reis, Mais u. Weizen [WO 99/16890], Amy32b, Amy 6-6 und Aleurain [US 5,677,474], Bce4 (Raps) [US 5,530,149], Glycinin (Soja) [EP 571 741], Phosphoenol-Pyruvatcarboxylase (Soja) [JP 06/62870], ADR12-2 (Soja) [WO 98/08962], Isocitratlyase (Raps) [US 5,689,040] oder α -Amylase (Gerste) [EP 781 849].

Die Pflanzengenexpression lässt sich auch über einen chemisch induzierbaren
30 Promotor erleichtern (siehe eine Übersicht in Gatz 1997, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48:89-108). Chemisch induzierbare Promotoren eignen sich besonders, wenn gewünscht wird, dass die Genexpression auf zeitspezifische Weise erfolgt. Beispiele für solche Promotoren sind ein Salicylsäure-induzierbarer Promotor
35 (WO 95/19443), ein Tetracyclin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) *Plant J.* 2, 397-404) und ein Ethanol-induzierbarer Promotor.

Um eine stabile Integration der Biosynthesegene in die transgene Pflanze über
mehrere Generation sicherzustellen, sollte jede der im Verfahren verwendeten
40 Nukleinsäuren, die für die Δ -12-Desaturase, Δ -6-Desaturase, Δ -6-Elongase, Δ -5-Desaturase, Δ -5-Elongase und/oder Δ -4-Desaturase codieren, unter der Kontrolle eines eigenen bevorzugt eines unterschiedlichen Promotors exprimiert werden, da sich

wiederholende Sequenzmotive zu Instabilität der T-DNA bzw. zu Rekombinationseignissen führen können. Die Expressionskassette ist dabei vorteilhaft so aufgebaut, dass einem Promotor eine geeignete Schnittstelle zur Insertion der zu exprimierenden Nukleinsäure folgt vorteilhaft in einem Polylinker anschließend gegebenenfalls ein Terminator hinter dem Polylinker liegt. Diese Abfolge wiederholt sich mehrfach bevorzugt drei-, vier- oder fünfmal, so dass bis zu fünf Gene in einem Konstrukt zusammengeführt werden und so zur Expression in die transgene Pflanze eingebracht werden können. Vorteilhaft wiederholt sich die Abfolge bis zu dreimal.

Die Nukleinsäuresequenzen werden zur Expression über die geeignete Schnittstelle beispielsweise im Polylinker hinter den Promotor inseriert. Vorteilhaft hat jede Nukleinsäuresequenz ihren eigenen Promotor und gegebenenfalls ihren eigenen Terminator. Derartige vorteilhafte Konstrukte werden beispielsweise in DE 10102337 oder DE 10102338 offenbart. Es ist aber auch möglich mehrere Nukleinsäuresequenzen hinter einem Promotor und ggf. vor einem Terminator zu inserieren. Dabei ist die Insertionsstelle bzw. die Abfolge der inserierten Nukleinsäuren in der Expressionskassette nicht von entscheidender Bedeutung, das heißt eine Nukleinsäuresequenz kann an erster oder letzter Stelle in der Kassette inseriert sein, ohne dass dadurch die Expression wesentlich beeinflusst wird. Es können in der Expressionskassette vorteilhaft unterschiedliche Promotoren wie beispielsweise der USP-, LegB4 oder DC3-Promotor und unterschiedliche Terminatoren verwendet werden. Es ist aber auch möglich nur einen Promotortyp in der Kassette zu verwenden. Dies kann jedoch zu unerwünschten Rekombinationsereignissen führen.

Wie oben beschrieben sollte die Transkription der eingebrachten Gene vorteilhaft durch geeignete Terminatoren am 3'-Ende der eingebrachten Biosynthesegene (hinter dem Stoppcodon) abgebrochen werden. Verwendet werden kann hier z.B. der OCS1 Terminator. Wie auch für die Promotoren, so sollten hier für jedes Gen unterschiedliche Terminatorsequenzen verwendet werden.

Das Genkonstrukt kann, wie oben beschrieben, auch weitere Gene umfassen, die in die Organismen eingebracht werden sollen. Es ist möglich und vorteilhaft, in die Wirtsorganismen Regulationsgene, wie Gene für Induktoren, Repressoren oder Enzyme, welche durch ihre Enzymaktivität in die Regulation eines oder mehrerer Gene eines Biosynthesewegs eingreifen, einzubringen und darin zu exprimieren. Diese Gene können heterologen oder homologen Ursprungs sein. Weiterhin können vorteilhaft im Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt weitere Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels enthalten sein oder aber diese Gene können auf einem weiteren oder mehreren weiteren Nukleinsäurekonstrukten liegen. Vorteilhaft werden als Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ein Gen ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lipophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenase(n), Lipoxigenase(n), Triacylglycerol-Lipase(n), Allenoxid-Synthase(n), Hydroperoxid-Lyase(n) oder Fettsäure-Elongase(n)

oder deren Kombinationen verwendet. Besonders vorteilhafte Nukleinsäuresequenzen sind Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe der Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase, Δ -4-Desaturase, Δ -5-Desaturase, Δ -6-Desaturase, Δ -9-Desaturase, Δ -12-Desaturase, Δ -5-Elongase und/oder Δ -6-Elongase.

Dabei können die vorgenannten Nukleinsäuren bzw. Gene in Kombination mit anderen Elongasen und Desaturasen in Expressionskassetten, wie den vorgenannten, kloniert werden und zur Transformation von Pflanzen Mithilfe von Agrobakterium eingesetzt werden.

- 10 Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei wie oben beschrieben vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhaft-
er Weise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine
15 Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird. Die Expressionskassetten können prinzipiell direkt zum Einbringen in die Pflanze verwendet werden oder aber in einen Vektoren eingebracht werden.

Diese vorteilhaften Vektoren, vorzugsweise Expressionsvektoren, enthalten die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die für die Δ -12-Desaturase, Δ -6-Desaturase,
20 Δ -6-Elongase, Δ -5-Desaturasen, Δ -5-Elongase oder Δ -4-Desaturase codieren, oder ein Nukleinsäurekonstrukt, die die verwendeten Nukleinsäure allein oder in Kombination mit weiteren Biosynthesegenen des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels wie den Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen, Δ -4-Desaturasen, Δ -5-Desaturasen, Δ -6-Desaturasen, Δ -9-Desaturasen, Δ -12-Desaturasen, ω 3-Desaturasen, Δ -5-Elongasen und/oder Δ -6-Elongasen. Wie hier verwendet, betrifft der Begriff "Vektor" ein Nukleinsäuremolekül, das eine andere Nukleinsäure transportieren kann, an welche es gebunden ist. Ein Vektortyp ist ein "Plasmid", was für eine zirkuläre doppelsträngige DNA-Schleife steht, in die zusätzlichen DNA-Segmente ligiert werden können. Ein weiterer Vektortyp ist ein viraler Vektor, wobei zusätzliche DNA-Segmente in das
30 virale Genom ligiert werden können. Bestimmte Vektoren können in einer Wirtszelle, in die sie eingebracht worden sind, autonom replizieren (z.B. Bakterienvektoren mit bakteriellem Replikationsursprung). Andere Vektoren werden vorteilhaft beim Einbringen in die Wirtszelle in das Genom einer Wirtszelle integriert und dadurch zusammen mit dem Wirtsgenom repliziert. Zudem können bestimmte Vektoren die Expression von
35 Genen, mit denen sie funktionsfähig verbunden sind, steuern. Diese Vektoren werden hier als "Expressionsvektoren" bezeichnet. Gewöhnlich haben Expressionsvektoren, die für DNA-Rekombinationstechniken geeignet sind, die Form von Plasmiden. In der vorliegenden Beschreibung können "Plasmid" und "Vektor" austauschbar verwendet werden, da das Plasmid die am häufigsten verwendete Vektorform ist. Die Erfindung soll jedoch diese anderen Expressionsvektorformen, wie virale Vektoren,
40 die ähnliche Funktionen ausüben, umfassen. Ferner soll der Begriff Vektor auch andere Vektoren, die dem Fachmann bekannt sind, wie Phagen, Viren, wie SV40,

CMV, TMV, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Phagemide, Cosmide, lineare oder zirkuläre DNA, umfassen.

Die im Verfahren vorteilhaft verwendeten rekombinanten Expressionsvektoren umfassen die unten beschriebenen Nukleinsäuren oder das oben beschriebene
5 Genkonstrukt in einer Form, die sich zur Expression der verwendeten Nukleinsäuren in einer Wirtszelle eignen, was bedeutet, dass die rekombinanten Expressionsvektoren eine oder mehrere Regulationssequenzen, ausgewählt auf der Basis der zur Expression zu verwendenden Wirtszellen, die mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz funktionsfähig verbunden ist, umfasst. In einem rekombinanten Expressionsvektor
10 bedeutet "funktionsfähig verbunden", dass die Nukleotidsequenz von Interesse derart an die Regulationssequenz(en) gebunden ist, dass die Expression der Nukleotidsequenz möglich ist und sie aneinander gebunden sind, so dass beide Sequenzen die vorhergesagte, der Sequenz zugeschriebene Funktion erfüllen (z.B. in einem In-vitro-Transkriptions-/Translationssystem oder in einer Wirtszelle, wenn der Vektor in die
15 Wirtszelle eingebracht wird). Der Begriff "Regulationssequenz" soll Promotoren, Enhancer und andere Expressionskontrollelemente (z.B. Polyadenylierungssignale) umfassen. Diese Regulationssequenzen sind z.B. beschrieben in Goeddel: Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990), oder siehe: Gruber und Crosby, in: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, Florida, Hrsgb.: Glick und Thompson, Kapitel 7,
20 89-108, einschließlich der Literaturstellen darin. Regulationssequenzen umfassen solche, welche die konstitutive Expression einer Nukleotidsequenz in vielen Wirtszelltypen steuern, und solche, welche die direkte Expression der Nukleotidsequenz nur in bestimmten Wirtszellen unter bestimmten Bedingungen steuern. Der Fachmann weiß,
25 dass die Gestaltung des Expressionsvektors von Faktoren, wie der Auswahl der zu transformierenden Wirtszelle, dem Ausmaß der Expression des gewünschten Proteins usw., abhängen kann.

Die verwendeten rekombinanten Expressionsvektoren können zur Expression von Δ -12-Desaturasen, Δ -6-Desaturasen, Δ -6-Elongasen, Δ -5-Desaturasen, Δ -5-Elongasen
30 und/oder Δ -4-Desaturasen in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen gestaltet sein. Dies ist vorteilhaft, da häufig Zwischenschritte der Vektorkonstruktion der Einfachheit halber in Mikroorganismen durchgeführt werden. Beispielsweise können die Δ -12-Desaturase-, Δ -6-Desaturase-, Δ -6-Elongase-, Δ -5-Desaturase-, Δ -5-Elongase- und/oder Δ -4-Desaturase-Gene in bakteriellen Zellen, Insektenzellen (unter Verwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren), Hefe- und anderen Pilzzellen (siehe
35 Romanos, M.A., et al. (1992) "Foreign gene expression in yeast: a review", Yeast 8:423-488; van den Hondel, C.A.M.J.J., et al. (1991) "Heterologous gene expression in filamentous fungi", in: More Gene Manipulations in Fungi, J.W. Bennet & L.L. Lasure, Hrsgb., S. 396-428: Academic Press: San Diego; und van den Hondel, C.A.M.J.J., & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: Applied Molecular Genetics of Fungi, Peberdy, J.F., et al., Hrsgb.,
40 S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge), Algen (Falciatore et al., 1999, Marine Biotechnology.1, 3:239-251), Ciliaten der Typen: Holotrichia, Peritrichia,

Spirotrichia, Suctorina, Tetrahymena, Paramecium, Colpidium, Glaucoma, Platyophrya, Potomacus, Desaturaseudocohnilembus, Euplotes, Engelmaniella und Stylonychia, insbesondere der Gattung Stylonychia lemnae, mit Vektoren nach einem Transformationsverfahren, wie beschrieben in WO 98/01572, sowie bevorzugt in Zellen vielzelliger Pflanzen (siehe Schmidt, R. und Willmitzer, L. (1988) "High efficiency Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Arabidopsis thaliana leaf and cotyledon explants" Plant Cell Rep.:583-586; Plant Molecular Biology and Biotechnology, C Press, Boca Raton, Florida, Kapitel 6/7, S.71-119 (1993); F.F. White, B. Jené et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-43; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225 (und darin zitierte Literaturstellen)) exprimiert werden. Geeignete Wirtszellen werden ferner erörtert in Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Der rekombinante Expressionsvektor kann alternativ, zum Beispiel unter Verwendung von T7-Promotor-Regulationssequenzen und T7-Polymerase, in vitro transkribiert und translatiert werden.

Die Expression von Proteinen in Prokaryoten erfolgt meist mit Vektoren, die konstitutive oder induzierbare Promotoren enthalten, welche die Expression von Fusions- oder nicht-Fusionsproteinen steuern. Typische Fusions-Expressionsvektoren sind u.a. pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B., und Johnson, K.S. (1988) Gene 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) und pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), bei denen Glutathion-S-Transferase (GST); Maltose E-bindendes Protein bzw. Protein A an das rekombinante Zielprotein fusioniert wird.

Beispiele für geeignete induzierbare nicht-Fusions-E. coli-Expressionsvektoren sind u.a. pTrc (Amann et al. (1988) Gene 69:301-315) und pET 11d (Studier et al., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 60-89). Die Zielgenexpression vom pTrc-Vektor beruht auf der Transkription durch Wirts-RNA-Polymerase von einem Hybrid-trp-lac-Fusionspromotor. Die Zielgenexpression aus dem pET 11d-Vektor beruht auf der Transkription von einem T7-gn10-lac-Fusions-Promotor, die von einer coexprimierten viralen RNA-Polymerase (T7 gn1) vermittelt wird. Diese virale Polymerase wird von den Wirtstämmen BL21 (DE3) oder HMS174 (DE3) von einem residenten λ -Prophagen bereitgestellt, der ein T7 gn1-Gen unter der Transkriptionskontrolle des lacUV 5-Promotors birgt.

Andere in prokaryotischen Organismen geeignete Vektoren sind dem Fachmann bekannt, diese Vektoren sind beispielsweise in E. coli pLG338, pACYC184, die pBR-Reihe, wie pBR322, die pUC-Reihe, wie pUC18 oder pUC19, die M113mp-Reihe, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III113-B1, λ gt11 or pBdCl, in Streptomyces pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361, in Bacillus pUB110, pC194 oder pBD214, in Corynebacterium pSA77 oder pAJ667.

Bei einer weiteren Ausführungsform ist der Expressionsvektor ein Hefe-Expressionsvektor. Beispiele für Vektoren zur Expression in der Hefe *S. cerevisiae* umfassen pYeDesaturasec1 (Baldari et al. (1987) *Embo J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan und Herskowitz (1982) *Cell* 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) *Gene* 54:113-123) sowie pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren und Verfahren zur Konstruktion von Vektoren, die sich zur Verwendung in anderen Pilzen, wie den filamentösen Pilzen, eignen, umfassen diejenigen, die eingehend beschrieben sind in: van den Hondel, C.A.M.J.J., & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: *Applied Molecular Genetics of fungi*, J.F. Peberdy et al., Hrsgb., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge, oder in: *More Gene Manipulations in Fungi* [J.W. Bennet & L.L. Lasure, Hrsgb., S. 396-428: Academic Press: San Diego]. Weitere geeignete Hefevektoren sind beispielsweise pAG-1, YEp6, YEp13 oder pEMBLye23.

Alternativ kann die Δ -12-Desaturase, Δ -6-Desaturase, Δ -6-Elongase, Δ -5-Desaturase, Δ -5-Elongase und/oder Δ -4-Desaturase in Insektenzellen unter Verwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren exprimiert werden. Baculovirus-Vektoren, die zur Expression von Proteinen in gezüchteten Insektenzellen (z.B. Sf9-Zellen) verfügbar sind, umfassen die pAc-Reihe (Smith et al. (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) und die pVL-Reihe (Lucklow und Summers (1989) *Virology* 170:31-39).

Die oben genannten Vektoren bieten nur einen kleinen Überblick über mögliche geeignete Vektoren. Weitere Plasmide sind dem Fachmann bekannt und sind zum Beispiel beschrieben in: *Cloning Vectors* (Hrsgb. Pouwels, P.H., et al., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018). Weitere geeignete Expressionssysteme für prokaryotische und eukaryotische Zellen siehe in den Kapiteln 16 und 17 von Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Bei einer weiteren Ausführungsform des Verfahrens kann die Δ -12-Desaturase, Δ -6-Desaturase, Δ -6-Elongase, Δ -5-Desaturase, Δ -5-Elongase und/oder Δ -4-Desaturase in einzelligen Pflanzenzellen (wie Algen), siehe Falciatore et al., 1999, *Marine Biotechnology* 1 (3):239-251 und darin zitierte Literaturangaben, und Pflanzenzellen aus höheren Pflanzen (z.B. Spermatophyten, wie Feldfrüchten) exprimiert werden. Beispiele für Pflanzen-Expressionsvektoren umfassen solche, die eingehend beschrieben sind in: Becker, D., Kemper, E., Schell, J., und Masterson, R. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", *Plant Mol. Biol.* 20:1195-1197; und Bevan, M.W. (1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", *Nucl. Acids Res.* 12:8711-8721; *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants*; in: *Transgenic Plants*, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38.

Eine Pflanzen-Expressionskassette enthält vorzugsweise Regulationssequenzen, welche die Genexpression in Pflanzenzellen steuern können und funktionsfähig

verbunden sind, so dass jede Sequenz ihre Funktion, wie Termination der Transkription, erfüllen kann, beispielsweise Polyadenylierungssignale. Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind diejenigen, die aus *Agrobacterium tumefaciens*-T-DNA stammen, wie das als Octopinsynthese bekannte Gen 3 des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835ff.) oder funktionelle Äquivalente davon, aber auch alle anderen in Pflanzen funktionell aktiven Terminatoren sind geeignet.

Da die Pflanzengenexpression sehr oft nicht auf Transkriptionsebenen beschränkt ist, enthält eine Pflanzen-Expressions-kassette vorzugsweise andere funktionsfähig verbunden Sequenzen, wie Translationsenhancer, beispielsweise die Overdrive-Sequenz, welche die 5'-untranslatierte Leader-Sequenz aus Tabakmosaikvirus, die das Protein/RNA-Verhältnis erhöht, enthält (Gallie et al., 1987, Nucl. Acids Research 15:8693-8711).

Die Pflanzengenexpression muss wie oben beschrieben funktionsfähig mit einem geeigneten Promotor verbunden sein, der die Genexpression auf rechtzeitige, zell- oder gewebespezifische Weise durchführt. Nutzbare Promotoren sind konstitutive Promotoren (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989) 2195-2202), wie diejenigen, die von Pflanzenviren stammen, wie 35S CAMV (Franck et al., Cell 21 (1980) 285-294), 19S CaMV (siehe auch US 5352605 und WO 84/02913) oder Pflanzenpromotoren, wie der in US 4,962,028 beschriebene der kleinen Untereinheit der Rubisco.

Andere bevorzugte Sequenzen für die Verwendung zur funktionsfähigen Verbindung in Pflanzengenexpressions-Kassetten sind Targeting-Sequenzen, die zur Steuerung des Genproduktes in sein entsprechendes Zellkompartiment notwendig sind (siehe eine Übersicht in Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996) 285-423 und darin zitierte Literaturstellen), beispielsweise in die Vakuole, den Zellkern, alle Arten von Plastiden, wie Amyloplasten, Chloroplasten, Chromoplasten, den extrazellulären Raum, die Mitochondrien, das Endoplasmatische Retikulum, Ölkörper, Peroxisomen und andere Kompartimente von Pflanzenzellen.

Die Pflanzengenexpression lässt sich auch wie oben beschrieben über einen chemisch induzierbaren Promotor erleichtern (siehe eine Übersicht in Gatz 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48:89-108). Chemisch induzierbare Promotoren eignen sich besonders, wenn gewünscht wird, dass die Genexpression auf zeitspezifische Weise erfolgt. Beispiele für solche Promotoren sind ein Salicylsäure-induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein Tetracyclin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J. 2, 397-404) und ein Ethanol-induzierbarer Promotor.

Auch Promotoren, die auf biotische oder abiotische Stressbedingungen reagieren, sind geeignete Promotoren, beispielsweise der pathogeninduzierte PRP1-Gen-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993) 361-366), der hitzeinduzierbare hsp80-Promotor aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare Alpha-Amylase-Promotor aus Kartoffel (WO 96/12814) oder der durch Wunden induzierbare pinII-Promotor (EP-A-0 375 091).

Es sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, welche die Genexpression in Geweben und Organen herbeiführen, in denen die Fettsäure-, Lipid- und Ölsynthese stattfindet, in Samenzellen, wie den Zellen des Endosperms und des sich entwickelnden Embryos. Geeignete Promotoren sind der Napingen-Promotor aus Raps (US 5,608,152), der USP-Promotor aus *Vicia faba* (Bäumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3):459-67), der Oleosin-Promotor aus *Arabidopsis* (WO 98/45461), der Phaseolin-Promotor aus *Phaseolus vulgaris* (US 5,504,200), der Bce4-Promotor aus *Brassica* (WO 91/13980) oder der Legumin-B4-Promotor (LeB4; Bäumlein et al., 1992, Plant Journal, 2 (2):233-9) sowie Promotoren, welche die samenspezifische Expression in Monokotyledonen-Pflanzen, wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis usw. herbeiführen. Geeignete beachtenswerte Promotoren sind der lpt2- oder lpt1-Gen-Promotor aus Gerste (WO 95/15389 und WO 95/23230) oder die in WO 99/16890 beschriebenen (Promotoren aus dem Gersten-Hordein-Gen, dem Reis-Glutelin-Gen, dem Reis-Oryzin-Gen, dem Reis-Prolamin-Gen, dem Weizen-Gliadin-Gen, Weizen-Glutelin-Gen, dem Mais-Zein-Gen, dem Hafer-Glutelin-Gen, dem Sorghum-Kasirin-Gen, dem Roggen-Secalin-Gen).

Insbesondere kann die multiparallele Expression der im Verfahren verwendeten Δ -12-Desaturase, Δ -6-Desaturase, Δ -6-Elongase, Δ -5-Desaturase, Δ -5-Elongase und/oder Δ -4-Desaturase gewünscht sein. Die Einführung solcher Expressionskassetten kann über eine simultane Transformation mehrerer einzelner Expressionskonstrukte erfolgen oder bevorzugt durch Kombination mehrerer Expressionskassetten auf einem Konstrukt. Auch können mehrere Vektoren mit jeweils mehreren Expressionskassetten transformiert und auf die Wirtszelle übertragen werden.

Ebenfalls besonders geeignet sind Promotoren, welche die plastidenspezifische Expression herbeiführen, da Plastiden das Kompartiment sind, in dem die Vorläufer sowie einige Endprodukte der Lipidbiosynthese synthetisiert werden. Geeignete Promotoren, wie der virale RNA-Polymerase-Promotor, sind beschrieben in WO 95/16783 und WO 97/06250, und der clpP-Promotor aus *Arabidopsis*, beschrieben in WO 99/46394.

Vektor-DNA lässt sich in prokaryotische oder eukaryotische Zellen über herkömmliche Transformations- oder Transfektionstechniken einbringen. Die Begriffe "Transformation" und "Transfektion", Konjugation und Transduktion, wie hier verwendet, sollen eine Vielzahl von im Stand der Technik bekannten Verfahren zum Einbringen fremder Nukleinsäure (z.B. DNA) in eine Wirtszelle, einschließlich Calciumphosphat- oder Calciumchlorid-Copräzipitation, DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion, Lipofektion, natürliche Kompetenz, chemisch vermittelter Transfer, Elektroporation oder Teilchenbeschuss, umfassen. Geeignete Verfahren zur Transformation oder Transfektion von Wirtszellen, einschließlich Pflanzenzellen, lassen sich finden in Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual., 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) und anderen Labor-Handbüchern, wie Methods in Molecular Biology, 1995, Bd. 44, Agrobacterium protocols, Hrsgb: Gartland und Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey.

Wirtszellen, die im Prinzip zum Aufnehmen der erfindungsgemäßen Nukleinsäure, des erfindungsgemäßen Genproduktes oder des erfindungsgemäßen Vektors geeignet sind, sind alle prokaryotischen oder eukaryotischen Organismen. Die vorteilhafterweise verwendeten Wirtsorganismen sind Mikroorganismen, wie Pilze oder Hefen oder

5 Pflanzenzellen vorzugsweise Pflanzen oder Teile davon. Pilze, Hefen oder Pflanzen werden vorzugsweise verwendet, besonders bevorzugt Pflanzen, ganz besonders bevorzugt Pflanzen, wie Ölfruchtpflanzen, die große Mengen an Lipidverbindungen enthalten, wie Raps, Nachtkerze, Hanf, Diestel, Erdnuss, Canola, Lein, Soja, Saflor, Sonnenblume, Borretsch, oder Pflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale,

10 Reis, Gerste, Baumwolle, Maniok, Pfeffer, Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Alfalfa, Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten, Bäume (Ölplume, Kokosnuss) sowie ausdauernde Gräser und Futterfeldfrüchte. Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Pflanzen sind Ölfruchtpflanzen, wie Soja, Erdnuss, Raps, Canola, Lein, Hanf, Nachtkerze, Sonnen-

15 blume, Saflor, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss).

Weitere Erfindungsgegenstände sind die im folgenden aufgezählten Nukleinsäuresequenzen, die für Δ -6-Desaturasen, Δ -5-Desaturasen, Δ -4-Desaturasen oder Δ -12-Desaturasen codieren.

Isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit Δ -6-Desaturaseaktivität

20 codieren, ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 13 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 14 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- 25 c) Derivate der in SEQ ID NO: 13 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 14 codieren und eine Δ -6-Desaturaseaktivität aufweisen.

Isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit Δ -5-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:

- 30 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 9 oder in SEQ ID NO: 11 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 10 oder in SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder

- c) Derivate der in SEQ ID NO: 9 oder in SEQ ID NO: 11 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 10 oder in SEQ ID NO: 12 codieren und eine Δ -5-Desaturaseaktivität aufweisen.
- 5 Isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit Δ -4-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:
- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 7 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 8 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- 10 c) Derivate der in SEQ ID NO: 7 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 8 codieren und eine Δ -6-Desaturaseaktivität aufweisen.
- Isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit Δ -12-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:
- 15 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 15 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 16 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- 20 c) Derivate der in SEQ ID NO: 15 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 50 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 16 codieren und eine Δ -12-Desaturaseaktivität aufweisen.
- Die oben genannte erfindungsgemäßen Nukleinsäuren stammen von Organismen, wie nicht-humanen Tieren, Ciliaten, Pilzen, Pflanzen wie Algen oder Dinoflagellaten, die PUFAs synthetisieren können.
- 25 Vorteilhaft stammen die isolierten oben genannten Nukleinsäuresequenzen aus der Ordnung Salmoniformes, den Diatomeengattungen Thalassiosira oder Crythecodinium oder aus der Familie der Prasinophyceae wie der Gattung Ostreococcus oder Pythiaceae wie der Gattung Phytophthora stammt.
- 30 Zu den erfindungsgemäßen Gegenständen gehören außerdem, wie oben beschrieben, isolierte Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit Δ -12-Desaturasen, Δ -4-Desaturasen, Δ -5-Desaturasen und Δ -6-Desaturasen codieren, wobei die durch diese Nukleinsäuresequenzen codierten Δ -12-Desaturasen, Δ -4-Desaturasen, Δ -5-Desaturasen oder Δ -6-Desaturasen C₁₈-, C₂₀- und C₂₂-Fettsäuren mit ein, zwei, drei,
- 35 vier oder fünf Doppelbindungen und vorteilhaft mehrfach ungesättigte C₁₈-Fettsäuren mit ein, zwei oder drei Doppelbindungen wie C18:1 ^{Δ 9}, C18:2 ^{Δ 9,12} oder C18:3 ^{Δ 9,12,15},

mehrfach ungesättigte C₂₀-Fettsäuren mit drei oder vier Doppelbindungen wie C20:3^{Δ8,11,14} oder C20:4^{Δ8,11,14,17} oder mehrfach ungesättigte C₂₂-Fettsäuren mit vier oder fünf Doppelbindungen wie C22:4^{Δ7,10,13,16} oder C22:5^{Δ7,10,13,16,19} umsetzen. Vorteilhaft werden die Fettsäuren in den Phospholipiden oder CoA-Fettsäureestern desaturiert, vorteilhaft in den CoA-Fettsäureester.

Der Begriff "Nukleinsäure(molekül)", wie hier verwendet, umfasst in einer vorteilhaften Ausführungsform zudem die am 3'- und am 5'-Ende des kodierenden Genbereichs gelegene untranslatierte Sequenz: mindestens 500, bevorzugt 200, besonders bevorzugt 100 Nukleotide der Sequenz stromaufwärts des 5'-Endes des kodierenden Bereichs und mindestens 100, bevorzugt 50, besonders bevorzugt 20 Nukleotide der Sequenz stromabwärts des 3'-Endes des kodierenden Genbereichs. Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül wird von anderen Nukleinsäuremolekülen abgetrennt, die in der natürlichen Quelle der Nukleinsäure vorliegen. Eine "isolierte" Nukleinsäure hat vorzugsweise keine Sequenzen, welche die Nukleinsäure in der genomischen DNA des Organismus, aus dem die Nukleinsäure stammt, natürlicherweise flankieren (z.B. Sequenzen, die sich an den 5'- und 3'-Enden der Nukleinsäure befinden). Bei verschiedenen Ausführungsformen kann das isolierte Δ-12-Desaturase-, Δ-6-Desaturase-, Δ-6-Elongase-, Δ-5-Desaturase-, Δ-5-Elongase- oder Δ-4-Desaturasemolekül zum Beispiel weniger als etwa 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb oder 0,1 kb an Nukleotidsequenzen enthalten, die natürlicherweise das Nukleinsäuremolekül in der genomischen DNA der Zelle, aus der die Nukleinsäure stammt flankieren.

Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuremoleküle, z.B. ein Nukleinsäuremolekül mit einer Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 oder SEQ ID NO: 15 oder eines Teils davon, kann unter Verwendung molekularbiologischer Standardtechniken und der hier bereitgestellten Sequenzinformation isoliert werden. Auch kann Mithilfe von Vergleichsalgorithmen beispielsweise eine homologe Sequenz oder homologe, konservierte Sequenzbereiche auf DNA oder Aminosäureebene identifiziert werden. Diese können als Hybridisierungssonde sowie Standard-Hybridisierungstechniken (wie z.B. beschrieben in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) zur Isolierung weiterer im Verfahren nützlicher Nukleinsäuresequenzen verwendet werden. Überdies lässt sich ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine vollständige Sequenz der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 oder SEQ ID NO: 15 oder einen Teil davon, durch Polymerasekettenreaktion isolieren, wobei Oligonukleotidprimer, die auf der Basis dieser Sequenz oder von Teilen davon, verwendet werden (z.B. kann ein Nukleinsäuremolekül, umfassend die vollständigen Sequenz oder einen Teil davon, durch Polymerasekettenreaktion unter Verwendung von Oligonukleotidprimern isoliert werden, die auf der Basis dieser gleichen Sequenz erstellt worden sind). Zum Beispiel lässt sich mRNA aus Zellen isolieren (z.B. durch das Guanidiniumthiocyanat-Extraktionsverfahren von Chirgwin et al. (1979) Biochemistry 18:5294-5299) und cDNA mittels Reverser Transkriptase (z.B. Moloney-MLV-

Reverse-Transkriptase, erhältlich von Gibco/BRL, Bethesda, MD, oder AMV-Reverse-Transkriptase, erhältlich von Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL) herstellen. Synthetische Oligonukleotidprimer zur Amplifizierung mittels Polymerasekettenreaktion lassen sich auf der Basis einer der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 oder SEQ ID NO: 15 gezeigten Sequenzen oder Mithilfe der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 oder SEQ ID NO: 16 dargestellten Aminosäuresequenzen erstellen. Eine erfindungsgemäße Nukleinsäure kann unter Verwendung von cDNA oder alternativ von genomischer DNA als Matrize und geeigneten Oligonukleotidprimern gemäß Standard-PCR-Amplifikationstechniken amplifiziert werden. Die so amplifizierte Nukleinsäure kann in einen geeigneten Vektor kloniert werden und mittels DNA-Sequenzanalyse charakterisiert werden. Oligonukleotide, die einer Desaturase-Nukleotidsequenz entsprechen, können durch Standard-Syntheseverfahren, beispielsweise mit einem automatischen DNA-Synthesegerät, hergestellt werden.

Homologe der verwendeten Δ -12-Desaturase-, Δ -6-Desaturase-, Δ -6-Elongase-, Δ -5-Desaturase-, Δ -5-Elongase- oder Δ -4-Desaturase-Nukleinsäuresequenzen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 oder SEQ ID NO: 15 bedeutet beispielsweise allelische Varianten mit mindestens etwa 40 oder 50 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 oder 70 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 oder 80 %, 90 % oder 95 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr Identität bzw. Homologie zu einer in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 oder SEQ ID NO: 15 gezeigten Nukleotidsequenzen oder ihren Homologen, Derivaten oder Analoga oder Teilen davon. Weiterhin sind isolierte Nukleinsäuremoleküle einer Nukleotidsequenz, die an eine der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 oder SEQ ID NO: 15 gezeigten Nukleotidsequenzen oder einen Teil davon hybridisieren, z.B. unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Unter einem Teil gemäß der Erfindung ist dabei zu verstehen, dass mindestens 25 Basenpaare (= bp), 50 bp, 75 bp, 100 bp, 125 bp oder 150 bp, bevorzugt mindestens 175 bp, 200 bp, 225 bp, 250 bp, 275 bp oder 300 bp, besonders bevorzugt 350 bp, 400 bp, 450 bp, 500 bp oder mehr Basenpaare für die Hybridisierung verwendet werden. Es kann auch vorteilhaft die Gesamtsequenz verwendet werden. Allelische Varianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die sich durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus/in der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 oder SEQ ID NO: 15 dargestellten Sequenz erhalten lassen, wobei aber die Absicht ist, dass die Enzymaktivität der davon herrührenden synthetisierten Proteine für die Insertion eines oder mehrerer Gene vorteilhafterweise beibehalten wird. Proteine, die noch die enzymatische Aktivität der Δ -12-Desaturase, Δ -6-Desaturase, Δ -6-Elongase, Δ -5-Desaturase, Δ -5-Elongase oder Δ -4-Desaturase besitzen, das heißt deren Aktivität im wesentlichen nicht reduziert ist, bedeutet Proteine mit mindestens 10 %, vorzugsweise 20 %, 40

besonders bevorzugt 30 %, ganz besonders bevorzugt 40 % der ursprünglichen Enzymaktivität, verglichen mit dem durch SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 oder SEQ ID NO: 15 kodierten Protein. Die Homologie wurde über den gesamten Aminosäure- bzw.

5 Nukleinsäuresequenzbereich berechnet. Für das Vergleichen verschiedener Sequenzen stehen dem Fachmann eine Reihe von Programmen, die auf verschiedenen Algorithmen beruhen zur Verfügung. Dabei liefern die Algorithmen von Needleman und Wunsch oder Smith und Waterman besonders zuverlässige Ergebnisse. Für die Sequenzvergleiche wurde das Programm PileUp verwendet (J. Mol. Evolution., 25, 10 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151-153) oder die Programme Gap und BestFit [Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443-453 (1970) und Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2; 482-489 (1981))], die im GCG Software-Paket [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991)] 15 enthalten sind. Die oben in Prozent angegebenen Sequenzhomologiewerte wurden mit dem Programm GAP über den gesamten Sequenzbereich mit folgenden Einstellungen ermittelt: Gap Weight: 50, Length Weight: 3, Average Match: 10.000 und Average Mismatch: 0.000. Die falls nicht anders angegeben als Standardeinstellungen immer für Sequenzvergleiche verwendet wurden.

20 Homologen der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 oder SEQ ID NO: 15 bedeuten beispielsweise auch bakterielle, Pilz- und Pflanzenhomologen, verkürzte Sequenzen, einzelsträngige DNA oder RNA der kodierenden und nicht-kodierenden DNA-Sequenz.

25 Homologen der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 oder SEQ ID NO: 15 bedeutet auch Derivate, wie beispielsweise Promotorvarianten. Die Promotoren stromaufwärts der angegebenen Nukleotidsequenzen können durch einen oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) modifiziert werden, ohne dass jedoch die Funktionalität oder Aktivität der Promotoren gestört wird. Es ist weiterhin möglich, dass die Aktivität der Promotoren durch Modifikation ihrer Sequenz erhöht ist oder dass sie 30 vollständig durch aktivere Promotoren, sogar aus heterologen Organismen, ersetzt werden.

35 Die vorgenannten Nukleinsäuren und Proteinmoleküle mit Δ -12-Desaturase-, Δ -6-Desaturase-, Δ -6-Elongase-, Δ -5-Desaturase-, Δ -5-Elongase- und/oder Δ -4-Desaturase-Aktivität, die am Stoffwechsel von Lipiden und Fettsäuren, PUFA-Cofaktoren und Enzymen oder am Transport lipophiler Verbindungen über Membranen beteiligt sind, werden im erfindungsgemäßen Verfahren zur Modulation der Produktion von PUFAs in transgenen Organismen vorteilhaft in Pflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Sojabohne, Erdnuss, Baumwolle, Linum Arten wie Öl- oder Faserlein, Brassica-Arten, wie Raps, Canola und Rübsen, Pfeffer, 40 Sonnenblume, Borretsch, Nachtkerze und Tagetes; Solanacaen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Maniok, Alfalfa, Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss) und aus-

dauernden Gräsern und Futterfeldfrüchten, entweder direkt (z.B. wenn die Überexpression oder Optimierung eines Fettsäurebiosynthese-Proteins einen direkten Einfluss auf die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion der Fettsäure aus modifizierten Organismen hat) verwendet und/oder können eine indirekt Auswirkung haben, die dennoch zu einer Steigerung der Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion der PUFAs oder einer Abnahme unerwünschter Verbindungen führt (z.B. wenn die Modulation des Stoffwechsels von Lipiden und Fettsäuren, Cofaktoren und Enzymen zu Veränderungen der Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion oder der Zusammensetzung der gewünschten Verbindungen innerhalb der Zellen führt, was wiederum die Produktion einer oder mehrerer Fettsäuren beeinflussen kann).

Die Kombination verschiedener Vorläufermoleküle und Biosyntheseenzyme führt zur Herstellung verschiedener Fettsäuremoleküle, was eine entscheidende Auswirkung auf die Zusammensetzung der Lipide hat. Da mehrfach ungesättigte Fettsäuren (= PUFAs) nicht nur einfach in Triacylglycerin sondern auch in Membranlipide eingebaut werden.

Besonders zur Herstellung von PUFAs, beispielsweise Stearidonsäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure eignen sich Brassicaceae, Boraginaceen, Primulaceen, oder Linaceen. Besonders vorteilhaft eignet sich Lein (*Linum usitatissimum*) zur Herstellung von PUFAs mit dem erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen vorteilhaft, wie beschrieben, in Kombination mit weiteren Desaturasen und Elongasen.

Die Lipidsynthese lässt sich in zwei Abschnitte unterteilen: die Synthese von Fettsäuren und ihre Bindung an sn-Glycerin-3-Phosphat sowie die Addition oder Modifikation einer polaren Kopfgruppe. Übliche Lipide, die in Membranen verwendet werden, umfassen Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide und Phosphoglyceride. Die Fettsäuresynthese beginnt mit der Umwandlung von Acetyl-CoA in Malonyl-CoA durch die Acetyl-CoA-Carboxylase oder in Acetyl-ACP durch die Acetyltransacylase. Nach einer Kondensationsreaktion bilden diese beiden Produktmoleküle zusammen Acetoacetyl-ACP, das über eine Reihe von Kondensations-, Reduktions- und Dehydratisierungsreaktionen umgewandelt wird, so dass ein gesättigtes Fettsäuremolekül mit der gewünschten Kettenlänge erhalten wird. Die Produktion der ungesättigten Fettsäuren aus diesen Molekülen wird durch spezifische Desaturasen katalysiert, und zwar entweder aerob mittels molekularem Sauerstoff oder anaerob (bezüglich der Fettsäuresynthese in Mikroorganismen siehe F.C. Neidhardt et al. (1996) *E. coli* und *Salmonella*. ASM Press: Washington, D.C., S. 612-636 und darin enthaltene Literaturstellen; Lengeler et al. (Hrsgb.) (1999) *Biology of Prokaryotes*. Thieme: Stuttgart, New York, und die enthaltene Literaturstellen, sowie Magnuson, K., et al. (1993) *Microbiological Reviews* 57:522-542 und die enthaltenen Literaturstellen). Die so hergestellten an Phospholipide gebundenen Fettsäuren müssen anschließend wieder für die weitere Elongationen aus den Phospholipiden in den FettsäureCoA-Ester-Pool überführt werden. Dies ermöglichen Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen. Weiterhin können diese Enzyme die elongierten Fettsäuren wieder von den CoA-Estern auf die

Phospholipide übertragen. Diese Reaktionsabfolge kann gegebenenfalls mehrfach durchlaufen werden.

5 Vorläufer für die PUFA-Biosynthese sind beispielsweise Ölsäure, Linol- und Linolensäure. Diese C₁₈-Kohlenstoff-Fettsäuren müssen auf C₂₀ und C₂₂ verlängert werden, damit Fettsäuren vom Eicosa- und Docosa-Kettentyp erhalten werden. Mithilfe der im Verfahren verwendeten Desaturasen wie der Δ-12-, Δ-4-, Δ-5- und Δ-6-Desaturasen und/oder der Δ-5-, Δ-6-Elongasen können Arachidonsäure, Eicosapentaensäure, Docosapentaensäure oder Docosahexaensäure vorteilhaft Eicosapentaensäure und/oder Docosahexaensäure hergestellt werden und anschließend für verschiedene Zwecke bei Nahrungsmittel-, Futter-, Kosmetik- oder pharmazeutischen Anwendungen verwendet werden. Mit den genannten Enzymen können C₂₀- und/oder C₂₂-Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft mindestens drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise C₂₀- oder C₂₂-Fettsäuren mit vorteilhaft vier, fünf oder sechs Doppelbindungen im Fettsäuremolekül hergestellt werden. Die Desaturierung kann vor oder nach Elongation der entsprechenden Fettsäure erfolgen. Daher führen die Produkte der Desaturaseaktivitäten und der möglichen weiteren Desaturierung und Elongation zu bevorzugten PUFAs mit höherem Desaturierungsgrad, einschließlich einer weiteren Elongation von C₂₀ zu C₂₂-Fettsäuren, zu Fettsäuren wie γ-Linolensäure, Dihomo-γ-linolensäure, Arachidonsäure, Stearidonsäure, Eicosatetraensäure oder Eicosapentaensäure. Substrate der verwendeten Desaturasen und Elongasen im erfindungsgemäßen Verfahren sind C₁₆-, C₁₈- oder C₂₀-Fettsäuren wie zum Beispiel Linolsäure, γ-Linolensäure, α-Linolensäure, Dihomo-γ-linolensäure, Eicosatetraensäure oder Stearidonsäure. Bevorzugte Substrate sind Linolsäure, γ-Linolensäure und/oder α-Linolensäure, Dihomo-γ-linolensäure bzw. Arachidonsäure, Eicosatetraensäure oder Eicosapentaensäure. Die synthetisierten C₂₀- oder C₂₂-Fettsäuren mit mindestens zwei, drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen in der Fettsäure fallen im erfindungsgemäßen Verfahren in Form der freien Fettsäure oder in Form ihrer Ester beispielsweise in Form ihrer Glyceride an.

30 Unter dem Begriff "Glycerid" wird ein mit ein, zwei oder drei Carbonsäureresten verestertes Glycerin verstanden (Mono-, Di- oder Triglycerid). Unter "Glycerid" wird auch ein Gemisch an verschiedenen Glyceriden verstanden. Das Glycerid oder das Glyceridgemisch kann weitere Zusätze, z.B. freie Fettsäuren, Antioxidantien, Proteine, Kohlenhydrate, Vitamine und/oder andere Substanzen enthalten.

35 Unter einem "Glycerid" im Sinne des erfindungsgemäßen Verfahrens werden ferner vom Glycerin abgeleitete Derivate verstanden. Dazu zählen neben den oben beschriebenen Fettsäureglyceriden auch Glycerophospholipide und Glyceroglycolipide. Bevorzugt seien hier die Glycerophospholipide wie Lecithin (Phosphatidylcholin), Cardiolipin, Phosphatidylglycerin, Phosphatidylserin und Alkylacylglycerophospholipide beispielhaft genannt.

40 Ferner müssen Fettsäuren anschließend an verschiedene Modifikationsorte transportiert und in das Triacylglycerin-Speicherlipid eingebaut werden. Ein weiterer wichtiger

Schritt bei der Lipidsynthese ist der Transfer von Fettsäuren auf die polaren Kopfgruppen, beispielsweise durch Glycerin-Fettsäure-Acyltransferase (siehe Frentzen, 1998, *Lipid*, 100(4-5):161-166).

- Veröffentlichungen über die Pflanzen-Fettsäurebiosynthese, Desaturierung, den Lipidstoffwechsel und Membrantransport von fetthaltigen Verbindungen, die Betaoxidation, Fettsäuremodifikation und Cofaktoren, Triacylglycerin-Speicherung und -Assemblierung einschließlich der Literaturstellen darin siehe in den folgenden Artikeln:
- 5 Kinney, 1997, *Genetic Engineering*, Hrsgb.: JK Setlow, 19:149-166; Ohlrogge und Browse, 1995, *Plant Cell* 7:957-970; Shanklin und Cahoon, 1998, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:611-641; Voelker, 1996, *Genetic Engineering*, Hrsgb.: JK
- 10 Setlow, 18:111-13; Gerhardt, 1992, *Prog. Lipid R.* 31:397-417; Gühnemann-Schäfer & Kindl, 1995, *Biochim. Biophys Acta* 1256:181-186; Kunau et al., 1995, *Prog. Lipid Res.* 34:267-342; Stymne et al., 1993, in: *Biochemistry and Molecular Biology of Membrane and Storage Lipids of Plants*, Hrsgb.: Murata und Somerville, Rockville, American
- 15 Society of Plant Physiologists, 150-158, Murphy & Ross 1998, *Plant Journal*. 13(1):1-16.

Die im Verfahren hergestellten PUFAs, umfassen eine Gruppe von Molekülen, die höhere Tiere nicht mehr synthetisieren können und somit aufnehmen müssen oder die höhere Tiere nicht mehr ausreichend selbst herstellen können und somit zusätzlich

20 aufnehmen müssen, obwohl sie leicht von anderen Organismen, wie Bakterien, synthetisiert werden, beispielsweise können Katzen Arachidonsäure nicht mehr synthetisieren.

Unter Phospholipiden im Sinne der Erfindung sind zu verstehen Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerin und/oder Phosphatidylinositol vorteilhafterweise Phosphatidylcholin. Die Begriffe Produktion oder Produktivität sind im Fachgebiet bekannt und beinhalten die Konzentration des Fermentationsproduktes (Verbindungen der Formel I), das in einer bestimmten Zeitspanne und einem bestimmten Fermentationsvolumen gebildet wird (z.B. kg Produkt pro Stunde pro Liter). Es umfasst auch die Produktivität innerhalb einer Pflanzenzelle oder einer Pflanze, das heißt den Gehalt an den gewünschten im Verfahren hergestellten Fettsäuren bezogen auf den Gehalt an allen Fettsäuren in dieser Zelle oder Pflanze. Der Begriff Effizienz der Produktion umfasst die Zeit, die zur Erzielung einer bestimmten Produktionsmenge nötig ist (z.B. wie lange die Zelle zur Aufrichtung einer bestimmten Durchsatzrate einer Feinchemikalie benötigt). Der Begriff

35 Ausbeute oder Produkt/Kohlenstoff-Ausbeute ist im Fachgebiet bekannt und umfasst die Effizienz der Umwandlung der Kohlenstoffquelle in das Produkt (d.h. die Feinchemikalie). Dies wird gewöhnlich beispielsweise ausgedrückt als kg Produkt pro kg Kohlenstoffquelle. Durch Erhöhen der Ausbeute oder Produktion der Verbindung wird die Menge der gewonnenen Moleküle oder der geeigneten gewonnenen Moleküle

40 dieser Verbindung in einer bestimmten Kulturmenge über einen festgelegten Zeitraum erhöht. Die Begriffe Biosynthese oder Biosyntheseweg sind im Fachgebiet bekannt und umfassen die Synthese einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Ver-

bindung, durch eine Zelle aus Zwischenverbindungen, beispielsweise in einem Mehrschritt- und stark regulierten Prozess. Die Begriffe Abbau oder Abbauweg sind im Fachgebiet bekannt und umfassen die Spaltung einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Verbindung, durch eine Zelle in Abbauprodukte (allgemeiner gesagt, kleinere oder weniger komplexe Moleküle) beispielsweise in einem Mehrschritt- und stark regulierten Prozess. Der Begriff Stoffwechsel ist im Fachgebiet bekannt und umfasst die Gesamtheit der biochemischen Reaktionen, die in einem Organismus stattfinden. Der Stoffwechsel einer bestimmten Verbindung (z.B. der Stoffwechsel einer Fettsäure) umfasst dann die Gesamtheit der Biosynthese-, Modifikations- und Abbauwege dieser Verbindung in der Zelle, die diese Verbindung betreffen.

Bei einer weiteren Ausführungsform kodieren Derivate des erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls wieder gegeben in SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 oder SEQ ID NO: 15 Proteine mit mindestens 40 %, vorteilhaft etwa 50 oder 60 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 oder 70 % und stärker bevorzugt mindestens etwa 70 oder 80 %, 80 bis 90 %, 90 bis 95 % und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr Homologie (= Identität) zu einer vollständigen Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 oder SEQ ID NO: 16. Die Homologie wurde über den gesamten Aminosäure- bzw. Nukleinsäuresequenzbereich berechnet. Für die Sequenzvergleiche wurde das Programm PileUp verwendet (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151-153) oder die Programme Gap und BestFit [Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443-453 (1970) und Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2; 482-489 (1981))], die im GCG Software-Paket [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991)] enthalten sind. Die oben in Prozent angegebenen Sequenzhomologiewerte wurden mit dem Programm BestFit über den gesamten Sequenzbereich mit folgenden Einstellungen ermittelt: Gap Weight: 50, Length Weight: 3, Average Match: 10.000 und Average Mismatch: 0.000. Die falls nicht anders angegeben als Standardeinstellungen immer für Sequenzvergleiche verwendet wurden.

Die Erfindung umfasst zudem Nukleinsäuremoleküle, die sich von einer der in SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 oder SEQ ID NO: 15 gezeigten Nukleotidsequenzen (und Teilen davon) aufgrund des degenerierten genetischen Codes unterscheiden und somit die gleiche Δ -12-Desaturase, Δ -6-Desaturase, Δ -5-Desaturase oder Δ -4-Desaturase codieren wie diejenige, die von den in SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 oder SEQ ID NO: 15 gezeigten Nukleotidsequenzen kodiert wird.

Zusätzlich zu den in SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 oder SEQ ID NO: 15 gezeigten Δ -12-Desaturasen, Δ -6-Desaturasen, Δ -5-Desaturasen oder Δ -4-Desaturasen erkennt der Fachmann, dass DNA-Sequenzpolymorphismen, die zu Änderungen in den Aminosäuresequenzen der Δ -12-Desaturase, Δ -6-Desaturase, Δ -5-Desaturase und/oder Δ -4-Desaturase führen, innerhalb einer Population existieren können. Diese genetischen Polymorphismen im Δ -12-Desaturase-, Δ -6-

- Desaturase-, Δ -5-Desaturase- und/oder Δ -4-Desaturase-Gen können zwischen Individuen innerhalb einer Population aufgrund von natürlicher Variation existieren. Diese natürlichen Varianten bewirken üblicherweise eine Varianz von 1 bis 5 % in der Nukleotidsequenz des Δ -12-Desaturase-, Δ -6-Desaturase-, Δ -5-Desaturase- und/oder
- 5 Δ -4-Desaturase-Gens. Sämtliche und alle dieser Nukleotidvariationen und daraus resultierende Aminosäurepolymorphismen in der Δ -12-Desaturase, Δ -6-Desaturase, Δ -5-Desaturase und/oder Δ -4-Desaturase, die das Ergebnis natürlicher Variation sind und die funktionelle Aktivität von nicht verändern, sollen im Umfang der Erfindung enthalten sein.
- 10 Für das erfindungsgemäße Verfahren vorteilhafte Nukleinsäuremoleküle können auf der Grundlage ihrer Homologie zu den hier offenbarten Δ -12-Desaturase-, Δ -5-Elongase-, Δ -6-Desaturase-, Δ -5-Desaturase-, Δ -4-Desaturase- und/oder Δ -6-Elongase-Nukleinsäuren unter Verwendung der Sequenzen oder eines Teils davon als Hybridisierungs-sonde gemäß Standard-Hybridisierungstechniken unter stringenten
- 15 Hybridisierungsbedingungen isoliert werden. Dabei können beispielsweise isolierte Nukleinsäuremoleküle verwendet werden, die mindestens 15 Nukleotide lang sind und unter stringenten Bedingungen mit dem Nukleinsäuremolekülen, die eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 oder SEQ ID NO: 15 umfassen, hybridisieren. Es
- 20 können auch Nukleinsäuren mindestens 25, 50, 100, 250 oder mehr Nukleotide verwendet werden. Der Begriff "hybridisiert unter stringenten Bedingungen", wie hier verwendet, soll Hybridisierungs- und Waschbedingungen beschreiben, unter denen Nukleotidsequenzen, die mindestens 60 % homolog zueinander sind, gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben. Die Bedingungen sind vorzugsweise derart, dass
- 25 Sequenzen, die mindestens etwa 65 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 75 % oder stärker zueinander homolog sind, gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben. Diese stringenten Bedingungen sind dem Fachmann bekannt und lassen sich in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6., finden. Ein bevorzugtes, nicht einschränken-
- 30 des Beispiel für stringente Hybridisierungsbedingungen sind Hybridisierungen in 6 x Natriumchlorid/Natriumcitrat (sodium chloride/sodium citrate = SSC) bei etwa 45°C, gefolgt von einem oder mehreren Waschschritten in 0,2 x SSC, 0,1 % SDS bei 50 bis 65°C. Dem Fachmann ist bekannt, dass diese Hybridisierungsbedingungen sich je nach dem Typ der Nukleinsäure und, wenn beispielsweise organische Lösungsmittel
- 35 vorliegen, hinsichtlich der Temperatur und der Konzentration des Puffers unterscheiden. Die Temperatur unterscheidet sich beispielsweise unter "Standard-Hybridisierungsbedingungen" je nach dem Typ der Nukleinsäure zwischen 42°C und 58°C in wässrigem Puffer mit einer Konzentration von 0,1 bis 5 x SSC (pH 7,2). Falls organisches Lösungsmittel im obengenannten Puffer vorliegt, zum Beispiel 50 %
- 40 Formamid, ist die Temperatur unter Standardbedingungen etwa 42°C. Vorzugsweise sind die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride zum Beispiel 0,1 x SSC und 20°C bis 45°C, vorzugsweise zwischen 30°C und 45°C. Vorzugsweise sind die Hybridisierungsbedingungen für DNA:RNA-Hybride zum Beispiel 0,1 x SSC und 30°C bis 55°C, vorzugsweise zwischen 45°C und 55°C. Die vorstehend genannten Hybridi-

- sierungstemperaturen sind beispielsweise für eine Nukleinsäure mit etwa 100 bp (= Basenpaare) Länge und einem G + C-Gehalt von 50 % in Abwesenheit von Formamid bestimmt. Der Fachmann weiß, wie die erforderlichen Hybridisierungsbedingungen anhand von Lehrbüchern, wie dem vorstehend erwähnten oder aus den folgenden
- 5 Lehrbüchern Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; Hames und Higgins (Hrsgb.) 1985, "Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (Hrsgb.) 1991, "Essential Molecular Biology: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford, bestimmt werden können.
- 10 Zur Bestimmung der prozentualen Homologie (= Identität) von zwei Aminosäuresequenzen (z.B. einer der Sequenzen der SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 oder SEQ ID NO: 16) oder von zwei Nukleinsäuren (z.B. SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 oder SEQ ID NO: 15)
- 15 werden die Sequenzen zum Zweck des optimalen Vergleichs untereinander geschrieben (z.B. können Lücken in die Sequenz eines Proteins oder einer Nukleinsäure eingefügt werden, um ein optimales Alignment mit dem anderen Protein oder der anderen Nukleinsäure zu erzeugen). Die Aminosäurereste oder Nukleotide an den entsprechenden Aminosäurepositionen oder Nukleotidpositionen werden dann
- 20 verglichen. Wenn eine Position in einer Sequenz durch den gleichen Aminosäurerest oder das gleiche Nukleotid wie die entsprechende Stelle in der anderen Sequenz belegt wird, dann sind die Moleküle an dieser Position homolog (d.h. Aminosäure- oder Nukleinsäure-"Homologie", wie hier verwendet, entspricht Aminosäure- oder Nukleinsäure-"Identität"). Die prozentuale Homologie zwischen den beiden Sequenzen ist eine
- 25 Funktion der Anzahl an identischen Positionen, die den Sequenzen gemeinsam sind (d.h. % Homologie = Anzahl der identischen Positionen/Gesamtanzahl der Positionen x 100). Die Begriffe Homologie und Identität sind damit als Synonym anzusehen. Die verwendeten Programme bzw. Algorithmen sind oben beschrieben.
- 30 Ein isoliertes Nukleinsäuremolekül, das für eine Δ -12-Desaturase, Δ -6-Desaturase, Δ -5-Desaturase, Δ -4-Desaturase, Δ -5-Elongase und/oder Δ -6-Elongase kodiert, die zu einer Proteinsequenz der SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 oder SEQ ID NO: 16 homolog ist, kann durch Einbringen einer oder mehrerer Nukleotidsubstitutionen, -additionen oder -deletionen in eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5,
- 35 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 oder SEQ ID NO: 15 erzeugt werden, so dass eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen, -additionen oder -deletionen in das kodierte Protein eingebracht werden. Mutationen können in eine der Sequenzen der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 oder SEQ ID NO: 15 durch Standard-
- 40 Techniken, wie stellenspezifische Mutagenese und PCR-vermittelte Mutagenese, eingebracht werden. Vorzugsweise werden konservative Aminosäuresubstitutionen an einer oder mehreren der vorhergesagten nicht-essentiellen Aminosäureresten hergestellt. Bei einer "konservativen Aminosäuresubstitution" wird der Aminosäurerest gegen

- einen Aminosäurerest mit einer ähnlichen Seitenkette ausgetauscht. Im Fachgebiet sind Familien von Aminosäureresten mit ähnlichen Seitenketten definiert worden. Diese Familien umfassen Aminosäuren mit basischen Seitenketten (z.B. Lysin, Arginin, Histidin), sauren Seitenketten (z.B. Asparaginsäure, Glutaminsäure), ungeladenen polaren Seitenketten (z.B. Glycin, Asparagin, Glutamin, Serin, Threonin, Tyrosin, Cystein), unpolaren Seitenketten, (z.B. Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin, Phenylalanin, Methionin, Tryptophan), beta-verzweigten Seitenketten (z.B. Threonin, Valin, Isoleucin) und aromatischen Seitenketten (z.B. Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan, Histidin). Ein vorhergesagter nicht-essentieller Aminosäurerest in einer Δ -12-Desaturase, Δ -6-Desaturase, Δ -5-Desaturase, Δ -4-Desaturase, Δ -5-Elongase oder Δ -6-Elongase wird somit vorzugsweise durch einen anderen Aminosäurerest aus der gleichen Seitenkettenfamilie ausgetauscht. Alternativ können bei einer anderen Ausführungsform die Mutationen zufallsgemäß über die gesamte oder einen Teil der Δ -12-Desaturase, Δ -6-Desaturase, Δ -5-Desaturase, Δ -4-Desaturase, Δ -5-Elongase oder Δ -6-Elongase kodierenden Sequenz eingebracht werden, z.B. durch Sättigungsmutagenese, und die resultierenden Mutanten können nach der hier beschriebenen Δ -12-Desaturase-, Δ -6-Desaturase-, Δ -5-Desaturase-, Δ -4-Desaturase-, Δ -5-Elongase- oder Δ -6-Elongase-Aktivität durchmustert werden, um Mutanten zu identifizieren, die die Δ -12-Desaturase-, Δ -6-Desaturase-, Δ -5-Desaturase-, Δ -4-Desaturase-, Δ -5-Elongase- oder Δ -6-Elongase-Aktivität beibehalten haben. Nach der Mutagenese einer der Sequenzen SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 oder SEQ ID NO: 15 kann das kodierte Protein rekombinant exprimiert werden, und die Aktivität des Proteins kann z.B. unter Verwendung der hier beschriebenen Tests bestimmt werden.
- Weitere Erfindungsgegenstände sind transgene nicht-humane Organismen, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 oder SEQ ID NO: 15 enthalten oder ein Genkonstrukt oder einen Vektor, die diese erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen enthalten. Vorteilhaft handelt es sich bei dem nicht-humanen Organismus um einen Mikroorganismus, ein nicht-humanes Tier oder eine Pflanze, besonders bevorzugt um eine Pflanze.

Diese Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele weiter veranschaulicht, die nicht als beschränkend aufgefasst werden sollten. Der Inhalt sämtlicher in dieser Patentanmeldung zitierten Literaturstellen, Patentanmeldungen, Patente und veröffentlichten Patentanmeldungen ist hier durch Bezugnahme aufgenommen.

35 Beispiele

Beispiel 1: Allgemeine Klonierungsverfahren:

- Die Klonierungsverfahren wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylon Membranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von Escherichia coli Zellen, Anzucht von Bakterien und die Sequenzanalyse rekombinanter DNA

wurden wie bei Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt.

Beispiel 2: Sequenzanalyse rekombinanter DNA:

5 Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma ABI nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA74, 5463-5467). Fragmente resultierend aus einer Polymerase Kettenreaktion wurden zur Vermeidung von Polymerasefehlern in zu exprimierenden Konstrukten sequenziert und überprüft.

Beispiel 3: Lipidextraktion aus Hefen und Samen:

10 Die Auswirkung der genetischen Modifikation in Pflanzen, Pilzen, Algen, Ciliaten oder auf die Produktion einer gewünschten Verbindung (wie einer Fettsäure) kann bestimmt werden, indem die modifizierten Mikroorganismen oder die modifizierte Pflanze unter geeigneten Bedingungen (wie den vorstehend beschriebenen) gezüchtet werden und das Medium und/oder die zellulären Komponenten auf die erhöhte Produktion des
15 gewünschten Produktes (d.h. von Lipiden oder einer Fettsäure) untersucht wird. Diese Analysetechniken sind dem Fachmann bekannt und umfassen Spektroskopie, Dünnschichtchromatographie, Färbeverfahren verschiedener Art, enzymatische und mikrobiologische Verfahren sowie analytische Chromatographie, wie Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (siehe beispielsweise Ullman, Encyclopedia of Industrial
20 Chemistry, Bd. A2, S. 89-90 und S. 443-613, VCH: Weinheim (1985); Fallon, A., et al., (1987) "Applications of HPLC in Biochemistry" in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17; Rehm et al. (1993) Biotechnology, Bd. 3, Kapitel III: "Product recovery and purification", S. 469-714, VCH: Weinheim; Belter, P.A., et al. (1988) Bioseparations: downstream processing for Biotechnology, John Wiley and
25 Sons; Kennedy, J.F., und Cabral, J.M.S. (1992) Recovery processes for biological Materials, John Wiley and Sons; Shaeiwitz, J.A., und Henry, J.D. (1988) Biochemical Separations, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. B3; Kapitel 11, S. 1-27, VCH: Weinheim; und Dechow, F.J. (1989) Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications).

30 Neben den oben erwähnten Verfahren werden Pflanzenlipide aus Pflanzenmaterial wie von Cahoon et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (22):12935-12940, und Browse et al. (1986) Analytic Biochemistry 152:141-145, beschrieben extrahiert. Die qualitative und quantitative Lipid- oder Fettsäureanalyse ist beschrieben bei Christie, William W., Advances in Lipid Methodology, Ayr/Scotland: Oily Press (Oily Press Lipid Library; 2);
35 Christie, William W., Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide - Ayr, Scotland: Oily Press, 1989, Repr. 1992, IX, 307 S. (Oily Press Lipid Library; 1); "Progress in Lipid Research, Oxford: Pergamon Press, 1 (1952) - 16 (1977) u.d.T.: Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids CODEN.

40 Zusätzlich zur Messung des Endproduktes der Fermentation ist es auch möglich, andere Komponenten der Stoffwechselwege zu analysieren, die zur Produktion der

gewünschten Verbindung verwendet werden, wie Zwischen- und Nebenprodukte, um die Gesamteffizienz der Produktion der Verbindung zu bestimmen. Die Analyseverfahren umfassen Messungen der Nährstoffmengen im Medium (z.B. Zucker, Kohlenwasserstoffe, Stickstoffquellen, Phosphat und andere Ionen), Messungen der Biomassezusammensetzung und des Wachstums, Analyse der Produktion üblicher Metabolite von Biosynthesewegen und Messungen von Gasen, die während der Fermentation erzeugt werden. Standardverfahren für diese Messungen sind in Applied Microbial Physiology; A Practical Approach, P.M. Rhodes und P.F. Stanbury, Hrsgb., IRL Press, S. 103-129; 131-163 und 165-192 (ISBN: 0199635773) und darin angegebenen Literaturstellen beschrieben.

Ein Beispiel ist die Analyse von Fettsäuren (Abkürzungen: FAME, Fettsäuremethylester; GC-MS, Gas-Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie; TAG, Triacylglycerin; TLC, Dünnschichtchromatographie).

Der unzweideutige Nachweis für das Vorliegen von Fettsäureprodukten kann mittels Analyse rekombinanter Organismen nach Standard-Analyseverfahren erhalten werden: GC, GC-MS oder TLC, wie verschiedentlich beschrieben von Christie und den Literaturstellen darin (1997, in: Advances on Lipid Methodology, Vierte Aufl.: Christie, Oily Press, Dundee, 119-169; 1998, Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Verfahren, Lipide 33:343-353).

Das zu analysierende Material kann durch Ultraschallbehandlung, Mahlen in der Glasmühle, flüssigen Stickstoff und Mahlen oder über andere anwendbare Verfahren aufgebrochen werden. Das Material muss nach dem Aufbrechen zentrifugiert werden. Das Sediment wird in Aqua dest. resuspendiert, 10 min bei 100°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und erneut zentrifugiert, gefolgt von Extraktion in 0,5 M Schwefelsäure in Methanol mit 2 % Dimethoxypropan für 1 Std. bei 90°C, was zu hydrolysierten Öl- und Lipidverbindungen führt, die transmethylierte Lipide ergeben. Diese Fettsäuremethylester werden in Petrolether extrahiert und schließlich einer GC-Analyse unter Verwendung einer Kapillarsäule (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 Mikrom, 0,32 mm) bei einem Temperaturgradienten zwischen 170°C und 240°C für 20 min und 5 min bei 240°C unterworfen. Die Identität der erhaltenen Fettsäuremethylester muss unter Verwendung von Standards, die aus kommerziellen Quellen erhältlich sind (d.h. Sigma), definiert werden.

Pflanzenmaterial wird zunächst mechanisch durch Mörsern homogenisiert, um es einer Extraktion zugänglicher zu machen.

Dann wird 10 min auf 100°C erhitzt und nach dem Abkühlen auf Eis erneut sedimentiert. Das Zellsediment wird mit 1 M methanolischer Schwefelsäure und 2 % Dimethoxypropan 1h bei 90°C hydrolysiert und die Lipide transmethyliert. Die resultierenden Fettsäuremethylester (FAME) werden in Petrolether extrahiert. Die extrahierten FAME werden durch Gasflüssigkeitschromatographie mit einer Kapillarsäule (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 m, 0,32 mm) und einem Temperaturgradienten von 170°C auf 240°C in 20 min und 5 min bei 240°C analysiert. Die Identität der

Fettsäuremethylester wird durch Vergleich mit entsprechenden FAME-Standards (Sigma) bestätigt. Die Identität und die Position der Doppelbindung kann durch geeignete chemische Derivatisierung der FAME-Gemische z.B. zu 4,4-Dimethoxy-oxazolin-Derivaten (Christie, 1998) mittels GC-MS weiter analysiert werden.

5 Beispiel 4: Klonierung von Genen aus *Ostreococcus tauri*

Durch Suche nach konservierten Bereichen in den Proteinsequenzen in Elongase-Genen konnten zwei Sequenzen mit entsprechenden Motiven in einer *Ostreococcus tauri* Sequenzdatenbank (genomische Sequenzen) identifiziert werden. Es handelt sich dabei um die folgenden Sequenzen:

Gen-Name	SEQ ID	Aminosäuren
OtELO1, (Δ -5-Elongase)	SEQ ID NO: 1	300
OtELO2, (Δ -6-Elongase)	SEQ ID NO: 5	292

- 10 OtElo1 weist die höchste Ähnlichkeit zu einer Elongase aus *Danio rerio* auf (GenBank AAN77156; ca. 26 % Identität), während OtElo2 die größte Ähnlichkeit zur *Physcomitrella Elo* (PSE) [ca. 36 % Identität] aufweist (Alignments wurden mit dem tBLASTn-Algorithmus (Altschul et al., J. Mol. Biol. 1990, 215: 403 – 410) durchgeführt.

Die Klonierung wurde wie folgt durchgeführt:

- 15 40 ml einer *Ostreococcus tauri* Kultur in der stationären Phase wurden abzentrifugiert und in 100 μ l Aqua bidest resuspendiert und bei -20°C gelagert. Auf der Basis des PCR-Verfahren wurden die zugehörigen genomischen DNAs amplifiziert. Die entsprechenden Primerpaare wurden so ausgewählt, dass sie die Hefe-Konsensus-Sequenz für hocheffiziente Translation (Kozak, Cell 1986, 44:283-292) neben dem Startcodon
- 20 trugen. Die Amplifizierung der OtElo-DNAs wurde jeweils mit 1 μ l aufgetauten Zellen, 200 μ M dNTPs, 2,5 U *Taq*-Polymerase und 100 pmol eines jeden Primers in einem Gesamtvolumen von 50 μ l durchgeführt. Die Bedingungen für die PCR waren wie folgt: Erste Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten, gefolgt von 30 Zyklen bei 94°C für 30 Sekunden, 55°C für 1 Minute und 72°C für 2 Minuten sowie ein letzter Verlängerungsschritt bei 72°C für 10 Minuten.
- 25

Beispiel 5: Klonierung von Expressionsplasmiden zur heterologen Expression in Hefen:

- Zur Charakterisierung der Funktion der Elongasen aus *Ostreococcus tauri* wurden die offenen Leserahmen der jeweiligen DNAs stromabwärts des Galactose-induzierbaren
- 30 GAL1-Promotors von pYES2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen) kloniert, wobei pOTE1 und pOTE2 erhalten wurden.

Der *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm 334 wurde durch Elektroporation (1500 V) mit dem Vektor pOTE1 bzw. pOTE2 transformiert. Als Kontrolle wurde eine Hefe verwendet, die mit dem leeren Vektor pYES2 transformiert wurde. Die Selektion der transfor-

mierten Hefen erfolgte auf Komplett-Minimalmedium (CMdum)-Agarplatten mit 2% Glucose, aber ohne Uracil. Nach der Selektion wurden je drei Transformanten zur weiteren funktionellen Expression ausgewählt.

- 5 Für die Expression der Ot-Elongasen wurden zunächst Vorkulturen aus jeweils 5 ml CMdum-Flüssigmedium mit 2% (w/v) Raffinose aber ohne Uracil mit den ausgewählten Transformanten angeimpft und 2 Tage bei 30°C, 200 rpm inkubiert.
5 ml CMdum-Flüssigmedium (ohne Uracil) mit 2% Raffinose und 300 µM verschiedener Fettsäuren wurden dann mit den Vorkulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft.
10 Die Expression wurde durch die Zugabe von 2% (w/v) Galactose induziert. Die Kulturen wurden für weitere 96 h bei 20°C inkubiert.

Beispiel 6: Klonierung von Expressionsplasmiden zur Samen-spezifischen Expression in Pflanzen

- 15 Für die Transformation von Pflanzen wurde ein weiterer Transformationsvektor auf Basis von pSUN-USP erzeugt. Dazu wurden mittels PCR NotI-Schnittstellen am 5' und 3'-Ende der kodierenden Sequenzen eingefügt. Die entsprechenden Primersequenzen wurden von den 5'- und 3-Bereich von OtElo1 und OtElo2 abgeleitet.

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

- 5,00 µL Template cDNA
5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25mM MgCl₂
20 5,00 µL 2mM dNTP
1,25 µL je Primer (10 pmol/µL)
0,50 µL Advantage-Polymerase

Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.

Reaktionsbedingungen der PCR:

- 25 Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C
Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C
Elongationstemperatur: 2 min 72°C
Anzahl der Zyklen: 35

- 30 Die PCR Produkte wurden für 16 h bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym NotI inkubiert. Der Pflanzen-Expressionsvektor pSUN300-USP wurde in gleicherweise inkubiert. Anschliessend wurde die PCR Produkte sowie der Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäss Herstellerangaben. Anschliessend wurden Vektor und PCR-Produkte ligiert. Dazu
35 wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Die entstandenen Plasmide pSUN-OtELO1 und pSUN-OtELO2 wurde durch Sequenzierung verifiziert.

pSUN300 ist ein Derivat des Plasmides pPZP (Hajdukiewicz, P, Svab, Z, Maliga, P., (1994) The small versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant

- transformation. *Plant Mol Biol* 25:989-994). pSUN-USP entstand aus pSUN300, indem in pSUN300 ein USP-Promotor als EcoRI- Fragment inseriert wurde. Das Polyadenylierungssignal ist das des *Ostreococcus*-Gens aus dem *A. tumefaciens* Ti-Plasmid (ocs-Terminator, Genbank Accession V00088) (De Greve, H., Dhaese, P., Seurinck, J., Lemmers, M., Van Montagu, M. and Schell, J. Nucleotide sequence and transcript map of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid-encoded octopine synthase gene *J. Mol. Appl. Genet.* 1 (6), 499-511 (1982). Der USP-Promotor entspricht den Nukleotiden 1 bis 684 (Genbank Accession X56240), wobei ein Teil der nichtcodierenden Region des USP-Gens im Promotor enthalten ist. Das 684 Basenpaar große Promotorfragment wurde mittels käuflichen T7-Standardprimer (Stratagene) und mit Hilfe eines synthetisierten Primers über eine PCR-Reaktion nach Standardmethoden amplifiziert. (Primersequenz:
5'-GTCGACCCGCGGACTAGTGGGCCCTCTAGACCCGGGGGATCC
GGATCTGCTGGCTATGAA-3').
- Das PCR-Fragment wurde mit EcoRI/Sall nachgeschnitten und in den Vektor pSUN300 mit OCS Terminator eingesetzt. Es entstand das Plasmid mit der Bezeichnung pSUN-USP. Das Konstrukt wurde zur Transformation von *Arabidopsis thaliana*, Raps, Tabak und Leinsamen verwendet.

Beispiel 7: Expression von OtELO1 und OtELO2 in Hefen

- Hefen, die wie unter Beispiel 5 mit den Plasmiden pYES3, pYES3-OtELO1 und pYES3-OtELO2 transformiert wurden, wurden folgendermaßen analysiert:

Die Hefezellen aus den Hauptkulturen wurden durch Zentrifugation (100 x g, 5 min, 20°C) geerntet und mit 100 mM NaHCO₃, pH 8,0 gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Aus den Hefe-Zellsedimenten wurden Fettsäuremethylester (FAMES) durch saure Methanolyse hergestellt. Hierzu wurden die Zellsedimente mit 2 ml 1 N methanolischer Schwefelsäure und 2% (v/v) Dimethoxypropan für 1 h bei 80°C inkubiert. Die Extraktion der FAMES erfolgte durch zweimalige Extraktion mit Petrolether (PE). Zur Entfernung nicht derivatisierter Fettsäuren wurden die organischen Phasen je einmal mit 2 ml 100 mM NaHCO₃, pH 8,0 und 2 ml Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die PE-Phasen mit Na₂SO₄ getrocknet, unter Argon eingedampft und in 100 µl PE aufgenommen. Die Proben wurden auf einer DB-23-Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, Agilent) in einem Hewlett-Packard 6850-Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor getrennt. Die Bedingungen für die GLC-Analyse waren wie folgt: Die Ofentemperatur wurde von 50°C bis 250°C mit einer Rate von 5°C/min und schließlich 10 min bei 250°C (halten) programmiert.

Die Identifikation der Signale erfolgte durch Vergleiche der Retentionszeiten mit entsprechenden Fettsäurestandards (Sigma). Die Methodik ist beschrieben zum Beispiel in Napier and Michaelson, 2001, *Lipids*. 36(8):761-766; Sayanova et al., 2001, *Journal of Experimental Botany*. 52(360):1581-1585, Sperling et al., 2001, *Arch. Biochem. Biophys.* 388(2):293-298 und Michaelson et al., 1998, *FEBS Letters*. 439(3):215-218.

Beispiel 8: Funktionelle Charakterisierung von OtELO1 und OtELO2:

Die Substratspezifität der OtElo1 konnte nach Expression und Fütterung verschiedener Fettsäuren ermittelt werden (Tab. 2). Die gefütterten Substrate sind in großen Mengen in allen transgenen Hefen nachzuweisen. Die transgenen Hefen zeigten die Synthese neuer Fettsäuren, den Produkten der OtElo1-Reaktion. Dies bedeutet, dass das Gen OtElo1 funktional exprimiert werden konnte.

Tabelle 2 zeigt, dass die OtElo1 eine enge Substratspezifität aufweist. Die OtElo1 konnte nur die C20-Fettsäuren Eicosapentaensäure (Figur 2) und Arachidonsäure (Figur 3) elongieren, bevorzugte aber die ω -3-desaturierte Eicosapentaensäure.

10 Tabelle 2:

Fettsäuresubstrat	Umsatz (in %)
16:0	-
16:1^{Δ9}	-
18:0	-
18:1^{Δ9}	-
18:1^{Δ11}	-
18:2^{Δ9,12}	-
18:3^{Δ6,9,12}	-
18:3^{Δ5,9,12}	-
20:3^{Δ8,11,14}	-
20:4^{Δ5,8,11,14}	10,8 ± 0,6
20:5^{Δ5,8,11,14,17}	46,8 ± 3,6
22:4^{Δ7,10,13,16}	-
22:6^{Δ4,7,10,13,16,19}	-

Tabelle 2 zeigt die Substratspezifität der Elongase OtElo1 für C20 polyungesättigte Fettsäuren mit einer Doppelbindung in Δ 5 Position gegenüber verschiedenen Fettsäuren.

Die Hefen, die mit dem Vektor pOTE1 transformiert worden waren, wurden in Minimalmedium in Gegenwart der angegebenen Fettsäuren kultiviert. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert. Jeder Wert gibt den Mittelwert (n=3)

5 ± Standardabweichung wieder.

Die Substratspezifität der OtElo2 (SEQ ID NO: 1) konnte nach Expression und Fütterung verschiedener Fettsäuren ermittelt werden (Tab. 3). Die gefütterten Substrate sind in großen Mengen in allen transgenen Hefen nachzuweisen. Die transgenen Hefen zeigten die Synthese neuer Fettsäuren, den Produkten der OtElo2-Reaktion.

10 Dies bedeutet, dass das Gen OtElo2 funktional exprimiert werden konnte.

Tabelle 3:

Fettsäuresubstrat	Umsatz (in %)
16:0	-
16:1^{Δ9}	-
16:3^{Δ7,10,13}	-
18:0	-
18:1^{Δ6}	-
18:1^{Δ9}	-
18:1^{Δ11}	-
18:2^{Δ9,12}	-
18:3^{Δ6,9,12}	15,3±
18:3^{Δ5,9,12}	-
18:4^{Δ6,9,12,15}	21,1±
20:2^{Δ11,14}	-
20:3^{Δ8,11,14}	-
20:4^{Δ5,8,11,14}	-
20:5^{Δ5,8,11,14,17}	-
22:4^{Δ7,10,13,16}	-
22:5^{Δ7,10,13,16,19}	-
22:6^{Δ4,7,10,13,16,19}	-

Tabelle 3 zeigt die Substratspezifität der Elongase OtElo2 gegenüber verschiedenen Fettsäuren.

Die Hefen, die mit dem Vektor pOTE2 transformiert worden waren, wurden in Minimalmedium in Gegenwart der angegebenen Fettsäuren kultiviert. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert. Jeder Wert gibt den Mittelwert ($n=3$) \pm Standardabweichung wieder.

Die enzymatische Aktivität, die in Tabelle 3 wiedergegeben wird, zeigt klar, dass OtElo2 eine Δ -6-Elongase ist.

Beispiel 9: Rekonstitution der Synthese von DHA in Hefe

Die Rekonstitution der Biosynthese von DHA (22:6 ω 3) kann ausgehend von EPA (20:5 ω 3) bzw. Stearidonsäure (18:4 ω 3) durch die Coexpression der OtElo1 mit der Δ -4-Desaturase aus *Euglena gracilis* bzw. der Δ -5-Desaturase aus *Phaeodactylum tricornutum* und der Δ -4-Desaturase aus *Euglena gracilis* durchgeführt. Dazu wurden weiterhin die Expressionsvektoren pYes2-EgD4 und pESCLEu-PtD5 konstruiert. Der o.g. Hefestamm, der bereits mit dem pYes3-OtElo1 transformiert ist, kann dann weiter mit dem pYes2-EgD4 bzw. gleichzeitig mit pYes2-EgD4 und pESCLEu-PtD5 transformiert werden. Die Selektion der transformierten Hefen kann auf Komplet-Minimalmedium-Agarplatten mit 2% Glucose, aber ohne Tryptophan und Uracil im Falle des pYes3-OtElo/pYes2-EgD4-Stammes und ohne Tryptophan, Uracil und Leucin im Falle des pYes3-OtElo/pYes2-EgD4+pESCLEu-PtD5-Stammes erfolgen. Die Expression wird dann durch die Zugabe von 2% (w/v) Galactose induziert. Die Kulturen werden anschließend für weitere 120 h bei 15°C inkubiert.

Beispiel 10: Erzeugung von transgenen Pflanzen

a) Erzeugung transgener Rapspflanzen (verändert nach Moloney et al., 1992, Plant Cell Reports, 8:238-242)

Zur Erzeugung transgener Rapspflanzen werden die binäre Vektoren in *Agrobacterium tumefaciens* C58C1:pGV2260 oder *Escherichia coli* genutzt (Deblaere et al, 1984, Nucl. Acids. Res. 13, 4777-4788). Zur Transformation von Rapspflanzen (Var. Drakkar, NPZ Nordeutsche Pflanzenzucht, Hohenlieth, Deutschland), wird eine 1:50 Verdünnung einer Übernachtskultur einer positiv transformierten Agrobakterienkolonie in Murashige-Skoog Medium (Murashige und Skoog 1962 Physiol. Plant. 15, 473) mit 3 % Saccharose (3MS-Medium) benutzt. Petiolen oder Hypokotyledonen frisch gekeimter steriler Rapspflanzen (zu je ca. 1 cm²) werden dazu in einer Petrischale mit einer 1:50 Agrobakterienverdünnung für 5-10 Minuten inkubiert. Es folgt eine 3-tägige Colnkubation in Dunkelheit bei 25°C auf 3MS-Medium mit 0,8 % Bacto-Agar. Die Kultivierung erfolgt dann 3 Tage mit 16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkelheit. In wöchentlichem Rhythmus auf MS-Medium mit 500 mg/l Claforan (Cefotaxime-Natrium), 50 mg/l Kanamycin, 20 mikroM Benzylaminopurin (BAP) wird dann mit 1,6 g/l Glukose weiterinkubiert. Wachsende Sprosse werden auf MS-Medium mit 2 % Saccharose, 250 mg/l Claforan und 0,8 % Bacto-Agar überführt. Bildeten sich nach drei Wochen

keine Wurzeln, so wird als Wachstumshormon 2-Indolbuttersäure zum Bewurzeln zum Medium gegeben.

- Regenerierte Sprosse werden auf 2MS-Medium mit Kanamycin und Claforan erhalten, nach Bewurzelung in Erde überführt und nach Kultivierung für zwei Wochen in einer Klimakammer oder im Gewächshaus angezogen, zur Blüte gebracht, reife Samen geerntet und auf Elongase-Expression wie Δ -5-Elongase- oder Δ -6-Elongaseaktivität mittels Lipidanalysen untersucht. Linien mit erhöhten Gehalten an C20- und C22 mehrfachungesättigten Fettsäuren können so identifiziert werden.

b) Herstellung von transgenen Leinpflanzen

- 10 Die Herstellung von transgenen Leinpflanzen können zum Beispiel nach der Methode von Bell et al., 1999, In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 35(6):456-465 mittels particle bombardment erzeugt werden. Agrobakterien-vermittelte Transformationen können zum Beispiel nach Mlynarova et al. (1994), Plant Cell Report 13: 282-285 hergestellt werden.

- 15 Beispiel 11: Klonierung von Desaturasegenen aus *Ostreococcus tauri*

Durch Suche nach konservierten Bereichen in den Proteinsequenzen mit Hilfe von konservierten Motiven (His-Boxen, Domergue et al. 2002, Eur. J. Biochem. 269, 4105-4113) konnten fünf Sequenzen mit entsprechenden Motiven in einer *Ostreococcus tauri* Sequenzdatenbank (genomische Sequenzen) identifiziert werden. Es handelt sich dabei um die folgenden Sequenzen:

Gen-Name	SEQ ID	Aminosäuren	Homologie
OtD4	SEQ ID NO: 7	536	Δ -4-Desaturase
OtD5.1	SEQ ID NO: 9	201	Δ -5-Desaturase
OtD5.2	SEQ ID NO: 11	237	Δ -5-Desaturase
OtD6.1	SEQ ID NO: 13	457	Δ -6-Desaturase
OtFad2	SEQ ID NO: 15	361	Δ -12-Desaturase

Die Alignments zur Auffindung von Homologien der einzelnen Gene wurden mit dem tBLASTn-Aalgorithmus (Altschul et al., J. Mol. Biol. 1990, 215: 403 – 410) durchgeführt. Die Klonierung erfolgte wie folgt:

- 25 40 ml einer *Ostreococcus tauri* Kultur in der stationären Phase wurden abzentrifugiert und in 100 μ l Aqua bidest resuspendiert und bei -20°C gelagert. Auf der Basis des PCR-Verfahren wurden die zugehörigen genomischen DNAs amplifiziert. Die entsprechenden Primerpaare wurden so ausgewählt, dass sie die Hefe-Konsensus-Sequenz für hocheffiziente Translation (Kozak, Cell 1986, 44:283-292) neben dem Startcodon
- 30 trugen. Die Amplifizierung der OtDes-DNAs wurde jeweils mit 1 μ l aufgetauten Zellen,

200 μ M dNTPs, 2,5 U *Taq*-Polymerase und 100 pmol eines jeden Primers in einem Gesamtvolumen von 50 μ l durchgeführt. Die Bedingungen für die PCR waren wie folgt: Erste Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten, gefolgt von 30 Zyklen bei 94°C für 30 Sekunden, 55°C für 1 Minute und 72°C für 2 Minuten sowie ein letzter Verlängerungsschritt bei 72°C für 10 Minuten.

Folgende Primer wurden für die PCR eingesetzt:

OtD6.1 Forward: 5'gggtaccacataatgtgcgtggagacggaaaataacg3'

OtD6.1 Reverse: 5'ctcgagttagccgtctttccggagtgtggcc3'

Beim Vergleich der Aminosäure-Sequenz von Ot6.1 mit Sequenzen aus Datenbanken (National Center for Biotechnology, NCBI) durch BLAST (Altschul et al., J. Mol. Biol. 1990, 215: 403 – 410), zeigte sich, dass die höchste Sequenzähnlichkeit zu einer Δ 5-Desaturase aus *Thraustochytrium* sp. vorliegt (Tabelle 4, Auswahl von Desaturasen). Für den Vergleich wurde das Program GAP der vorgenannten Software benutzt.

Tabelle 4: Liste von Fettsäure-Desaturasen mit den höchsten Sequenzhomologien zur Δ 6-Desaturase von *Osterococcus*.

Organismus	Regio-spezifität	Identität (%)	Homology (%)	Accession number
<i>Thraustochytrium</i> sp. (mariner Protist)	Δ 5-Position	36	53	AF489588
<i>Mortierella alpina</i> (Pilz)	Δ 6-Position	19	35	AB070557
<i>Rhizopus oryzae</i> (Pilz)	Δ 6-Position	19	36	AY583316
<i>Caenorhabditis elegans</i> (Wurm)	Δ 6-Position	18	32	AF031477
<i>Amylomyces rouxii</i> (Pilz)	Δ 6-Position	19	35	AY392409
<i>Danio rerio</i> (Zebrafisch)	Δ 5-/ Δ 6-Position	20	38	AF309556
<i>Homo sapiens</i> (Mensch)	Δ 6-Position	21	36	AF134404
<i>Sparus aurata</i> (Fisch)	Δ 6-Position	20	38	AY055749

Beispiel: 12 Klonierung von Expressionsplasmiden zur heterologen Expression in Hefen:

- Zur Charakterisierung der Funktion der Desaturase OtD6.1 (= Δ -6-Desaturase) aus *Ostreococcus tauri* wurde der offene Leserahmen der DNA stromabwärts des Galactose-induzierbaren GAL1-Promotors von pYES2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen) kloniert, wobei der entsprechenden pYES2.1-OtD6.1 Klon erhalten wurde. In entsprechender Art und Weise können weitere Desaturase-Gene aus *Ostreococcus* kloniert werden.
- Der *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm 334 wurde durch Elektroporation (1500 V) mit dem Vektor pYES2.1-OtD6.1 transformiert. Als Kontrolle wurde eine Hefe verwendet, die mit dem leeren Vektor pYES2 transformiert wurde. Die Selektion der transformierten Hefen erfolgte auf Komplet-Minimalmedium (CMdum)-Agarplatten mit 2% Glucose, aber ohne Uracil. Nach der Selektion wurden je drei Transformanten zur weiteren funktionellen Expression ausgewählt.
- Für die Expression der OtD6.1 Desaturase wurden zunächst Vorkulturen aus jeweils 5 ml CMdum-Flüssigmedium mit 2% (w/v) Raffinose aber ohne Uracil mit den ausgewählten Transformanten angeimpft und 2 Tage bei 30°C, 200 rpm inkubiert. 5 ml CMdum-Flüssigmedium (ohne Uracil) mit 2% Raffinose und 300 μ M verschiedener Fettsäuren wurden dann mit den Vorkulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft. Die Expression wurde durch die Zugabe von 2% (w/v) Galactose induziert. Die Kulturen wurden für weitere 96 h bei 20°C inkubiert.

Beispiel: 13 Klonierung von Expressionsplasmiden zur Samen-spezifischen Expression in Pflanzen

- Für die Transformation von Pflanzen wird ein weiterer Transformationsvektor auf Basis von pSUN-USP erzeugt. Dazu werden mittels PCR NotI-Schnittstellen am 5' und 3'-Ende der kodierenden Sequenzen eingefügt. Die entsprechenden Primersequenzen werden von den 5'- und 3-Bereich der Desaturasen abgeleitet.

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 μ L):

- 5,00 μ L Template cDNA
 5,00 μ L 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25mM MgCl₂
 5,00 μ L 2mM dNTP
 1,25 μ L je Primer (10 pmol/ μ L)
 0,50 μ L Advantage-Polymerase

Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.

Reaktionsbedingungen der PCR:

Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C

Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C

Elongationstemperatur: 2 min 72°C

5 Anzahl der Zyklen: 35

Die PCR Produkte werden für 16 h bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym NotI inkubiert. Der Pflanzen-Expressionsvektor pSUN300-USP wird in gleicherweise inkubiert. Anschliessend werden die PCR Produkte sowie der Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgt mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäss Herstellerangaben. Anschliessend werden Vektor und PCR-Produkte ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Die entstandenen Plasmide werden durch Sequenzierung verifiziert.

10

pSUN300 ist ein Derivat des Plasmides pPZP (Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P., (1994) The small versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. *Plant Mol Biol* 25:989-994). pSUN-USP entstand aus pSUN300, indem in pSUN300 ein USP-Promotor als EcoRI-Fragment inseriert wurde. Das Polyadenylierungssignal ist das des *Ostreococcus*-Gens aus dem *A. tumefaciens* Ti-Plasmid (ocs-Terminator, Genbank Accession V00088) (De Greve, H., Dhaese, P., Seurinck, J., Lemmers, M., Van Montagu, M. and Schell, J. Nucleotide sequence and transcript map of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid-encoded octopine synthase gene *J. Mol. Appl. Genet.* 1 (6), 499-511 (1982). Der USP-Promotor entspricht den Nukleotiden 1 bis 684 (Genbank Accession X56240), wobei ein Teil der nichtcodierenden Region des USP-Gens im Promotor enthalten ist. Das 684 Basenpaar große Promotorfragment wurde mittels käuflichen T7-Standardprimer (Stratagene) und mit Hilfe eines synthetisierten Primers über eine PCR-Reaktion nach Standardmethoden amplifiziert. (Primersequenz: 5'-

15

20

25

GTGACCCGCGGACTAGTGGGCCCTCTAGACCCGGGGGATCC
GGATCTGCTGGCTATGAA-3').

30 Das PCR-Fragment wurde mit EcoRI/SalI nachgeschnitten und in den Vektor pSUN300 mit OCS Terminator eingesetzt. Es entstand das Plasmid mit der Bezeichnung pSUN-USP. Das Konstrukt wurde zur Transformation von *Arabidopsis thaliana*, Raps, Tabak und Leinsamen verwendet.

Beispiel: 14 Expression von OtDes6.1 in Hefen

35 Hefen, die wie unter Beispiel 11 mit den Plasmiden pYES2 und pYES2-OtDes6.1 transformiert wurden, wurden folgendermaßen analysiert:

Die Hefezellen aus den Hauptkulturen wurden durch Zentrifugation (100 x g, 5 min, 20°C) geerntet und mit 100 mM NaHCO₃, pH 8,0 gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Die Hefe-Zellsedimente wurden 4 h mit Chloroform/Methanol (1:1) extrahiert. Die resultierende organische Phase wurde mit 0,45 % NaCl extrahiert, mit Na₂SO₄ getrocknet und unter Vakuum evaporiert. Der Lipidextrakt wurde durch Dünnschicht-Chromatographie (Horizontal-Tank, Chloroform:Methanol:Essigsäure 65:35:8) weiter in die Lipidklassen Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylethanolamine (PE) und Neutral-Lipide (NL) aufgetrennt. Die verschiedenen aufgetrennten Spots auf der Dünnschichtplatte wurden abgekratzt. Für die gaschromatografische Analyse wurde Fettsäuremethylester (FAMES) durch saure Methanolyse hergestellt. Hierzu wurden die Zellsedimente mit 2 ml 1 N methanolischer Schwefelsäure und 2% (v/v) Dimethoxypropan für 1 h bei 80°C inkubiert. Die Extraktion der FAMES erfolgte durch zweimalige Extraktion mit Petrolether (PE). Zur Entfernung nicht derivatisierter Fettsäuren wurden die organischen Phasen je einmal mit 2 ml 100 mM NaHCO₃, pH 8,0 und 2 ml Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die PE-Phasen mit Na₂SO₄ getrocknet, unter Argon eingedampft und in 100 µl PE aufgenommen. Die Proben wurden auf einer DB-23-Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, Agilent) in einem Hewlett-Packard 6850-Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor getrennt. Die Bedingungen für die GLC-Analyse waren wie folgt: Die Ofentemperatur wurde von 50°C bis 250°C mit einer Rate von 5°C/min und schließlich 10 min bei 250°C(halten) programmiert.

Die Identifikation der Signale erfolgte durch Vergleiche der Retentionszeiten mit entsprechenden Fettsäurestandards (Sigma). Die Methodik ist beschrieben zum Beispiel in Napier and Michaelson, 2001, *Lipids*. 36(8):761-766; Sayanova et al., 2001, *Journal of Experimental Botany*. 52(360):1581-1585, Sperling et al., 2001, *Arch. Biochem. Biophys.* 388(2):293-298 und Michaelson et al., 1998, *FEBS Letters*. 439(3):215-218.

Für die Extraktion (Scherling et al. 1996, *J Biol Chem* 271, 22514-22521) von Acyl-CoA-Estern wurden 4 ml Hefe-Kultur (OD600=1,5) nach der Methode von) verwendet. Die Derivatisierung der Acyl-Co-Ester und deren Analyse durch HPLC wurde wie in Larson TR and Graham IA, 2001 *Plant J* 25, 115-125 beschrieben, durchgeführt.

Beispiel: 15 Funktionelle Charakterisierung von Desaturasen aus *Ostreococcus*:

Die Substratspezifität von Desaturasen kann nach Expression in Hefe (siehe Beispiele Klonierung von Desaturase-Genen, Hefeexpression) durch die Fütterung mittels verschiedener Hefen ermittelt werden. Beschreibungen für die Bestimmung der einzelnen Aktivitäten finden sich in WO 93/11245 für $\Delta 15$ -Desaturasen, WO 94/11516 für $\Delta 12$ -Desaturasen, WO 93/06712, US 5,614,393, US5614393, WO 96/21022, WO0021557 und WO 99/27111 für $\Delta 6$ -Desaturasen, Qiu et al. 2001, *J. Biol. Chem.*

276, 31561-31566 für Δ^4 -Desaturasen, Hong et al. 2002, Lipids 37,863-868 für Δ^5 -Desaturasen.

5 Tabelle 4 gibt die Substratspezifität der Desaturase OtDes6.1 gegenüber verschiedenen Fettsäuren wieder. Die Substratspezifität der OtDes6.1 konnte nach Expression und Fütterung verschiedener Fettsäuren ermittelt werden. Die gefütterten Substrate sind in großen Mengen in allen transgenen Hefen nachzuweisen. Die transgenen Hefen zeigten die Synthese neuer Fettsäuren, den Produkten der OtDes6.2-Reaktion (Fig. 4). Dies bedeutet, dass das Gen OtDes6.1 funktional exprimiert werden konnte.

10 Die Hefen, die mit dem Vektor pYES2-OtDes6.1 transformiert worden waren, wurden in Minimalmedium in Gegenwart der angegebenen Fettsäuren kultiviert. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert. Jeder Wert gibt den Mittelwert ($n=3$) \pm Standardabweichung wieder. Die Aktivität entspricht der Konversionsrate errechnet nach $[\text{Substrat}/(\text{Substrat}+\text{Produkt}) \cdot 100]$.

15 Tabelle 4 zeigt, dass die OtDes6.1 eine Substratspezifität für Linol- und Linolensäure (18:2 und 18:3) aufweist, da mit diesen Fettsäuren die höchsten Aktivitäten erreicht werden. Die Aktivität für Ölsäure (18:1) und Palmitoleinsäure (16:1) ist dagegen deutlich geringer. Die bevorzugte Umsetzung von Linol- und Linolensäure zeigt die Eignung dieser Desaturase für die Herstellung von polyungesättigten Fettsäuren.

20

Substrate	Aktivität in %
16:1 ^{Δ^9}	5,6
18:1 ^{Δ^9}	13,1
18:2 ^{$\Delta^9,12$}	68,7
18:3 ^{$\Delta^9,12,15$}	64,6

Figur 4 zeigt die Umsetzung von Linolsäure durch OtDes6.2. Die Analyse der FAMES erfolgte über Gaschrommatographie. Das gefütterte Substrat (C18:2) wird zu γ -C18:3 umgesetzt. Sowohl Edukt als auch das entstandene Produkt sind durch Pfeile markiert.

25 Kinetische Analyse der Fettsäureveränderungen in Acyl-CoA-Estern und Lipiden von Hefekulturen, die OtDes6.1 exprimieren:

Eine Kultur des Hefestammes INVSc1, transformiert mit pYES-Ot6.1 (siehe Beispiel 12), wurde für 24 h bei 30 °C in der Gegenwart von Galaktose inkubiert. Anschliessend

wurde 250 μ M Linolsäure (18:2 Δ 9,12) zugesetzt und zu verschiedenen Zeitpunkten Hefezellen entnommen und analysiert (0 min, 5 min, 1 h, 4 h). Analysiert wurden das Gesamtfettsäurespektrum durch GC (Fig. 6, links) bzw. die Acyl-CoA-Ester durch HPLC (Fig. 6, rechts).

- 5 Dabei kann beobachtet werden, dass die zugegebene Fettsäure (18:2 Δ 9,12) bereits beim ersten Messpunkt (5 min) sowohl in den Gesamtlipiden als auch in den Acyl-CoA-Estern detektierbar ist. Ebenfalls zu diesem frühen Zeitpunkt ist auch schon das Produkt der Reaktion der Ot6.1-Desaturase in den Acyl-CoA-Estern zu finden. Dieses Produkt bleibt über den weiteren Zeitverlauf quantitative stabil. In den Gesamtlipiden ist
10 das Produkt erst nach 4 h deutlich sichtbar. Die Detektion des Acyl-CoA-Ester-Produktes der Ot6.1-Desaturase bevor das Produkt in den Gesamtlipiden detektiert werden kann, spricht dafür, dass die Desaturase als Substrat CoA-Ester und nicht Phospholipide verwendet.

- In Figur 7 wird die Umsetzung von Linolsäure (= LA) und α -Linolensäure (= ALA) in
15 Gegenwart von OtDes6.1 zu γ -Linolensäure (= GLA) bzw. Stearidonsäure (= STA) wiedergegeben (Figur 5 A und C). Weiterhin zeigt Figur 5 die Umsetzung von Linolsäure (= LA) und α -Linolensäure (= ALA) in Gegenwart der Δ -6-Desaturase OtDes6.1 zusammen mit der Δ -6-Elongase PSE1 aus *Physcomitrella patens* (Zank et al. 2002, *Plant J.* 31:255-268) und der Δ -5-Desaturase PtD5 aus *Phaeodactylum tricornutum*
20 (Domergue et al. 2002, *Eur. J. Biochem.* 269, 4105-4113) zu Dihomo- γ -linolensäure (= DHGLA) und Arachidonsäure (= ARA, Figur 5 B) bzw. zu Dihomostearidonsäure (= DHSTA) bzw. Eicosapentaensäure (= EPA, Figur 5 D). Figur 5 zeigt deutlich, dass die Reaktionsprodukte GLA und STA der Δ -6-Desaturase OtDes6.1 in Gegenwart der Δ -6-Elongase PSE1 fast quantitativ zu DHGLA bzw. DHSTA elongiert wird. Die nachfolgende
25 Desaturierung durch die Δ -5-Desaturase PtD5 erfolgt ebenfalls reibungslos zu ARA bzw. EPA. Es werden ca. 25 – 30% des Elongaseprodukts desaturiert (Figur 5 B und D). Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die Rekonstitution von ARA bzw. EPA. Gemessen wurden die Gesamtfettsäuren. Verglichen mit Phospholipid-abhängigen Desaturasen wie z.B. beschrieben in Domergue et al. 2002, *Eur. J. Biochem.* 269,
30 4105-4113, ist ein deutlicher Anstieg (ca. 6fach) der Endprodukte ARA und EPA zu verzeichnen.

Tabelle 5: Rekonstituierung der Biosynthese von PUFA in Hefe.

Fettsäure	18:2 ^{Δ9,12} exogen zugesetzt		18:2 ^{Δ9,12,15} exogen zugesetzt	
	leerer Vektor	OtD6 + PSE1 + PtD5	leerer Vektor	OtD6 + PSE1 + PtD5
16:0	19,7 +/- 0,8	17,6 +/- 1,5	16,4 +/- 0,3	14,7 +/- 0,7
16:1 ^{Δ9}	22,2 +/- 1,1	19,9 +/- 1,6	24,6 +/- 0,4	22,4 +/- 1,6
18:0	6,8 +/- 0,5	6,0 +/- 0,8	6,7 +/- 0,2	6,0 +/- 0,2
18:1	15,8 +/- 0,5	23,2 +/- 2,9	21,1 +/- 0,7	27,4 +/- 2,9
18:2 ^{Δ9,12}	35,4 +/- 1,5	13,8 +/- 3,5	-	-
18:3 ^{Δ6,9,12}	-	0,5 +/- 0,1	-	-
18:3 ^{Δ9,12,15}	-	-	31,0 +/- 1,5	9,5 +/- 3,9
18:4 ^{Δ6,9,12,15}	-	-	-	0,5 +/- 0,1
20:2 ^{Δ11,14}	-	0,8 +/- 0,4	-	-
20:3 ^{Δ8,11,14}	-	13,6 +/- 2,2	-	-
20:4 ^{Δ5,8,11,14}	-	4,5 +/- 0,9	-	-
20:3 ^{Δ11,14,17}	-	-	-	0,6 +/- 0,2
20:4 ^{Δ8,11,14,17}	-	-	-	13,4 +/- 3,6
20:5 ^{Δ5,8,11,14,17}	-	-	-	4,7 +/- 0,4

Die Synthese von isoARA (20:4^{Δ8,11,14,17}) wurde in einem ähnlichen Experiment wie oben beschrieben auch im CoA-Ester-Pool untersucht. Dazu wurde eine Hefekultur transformiert mit pYES-Ot6.1 und pLEU-PSE1 (beschrieben in Domergue et al. 2002, Eur. J. Biochem. 269, 4105-4113) angezogen und Linolensäure (18:3^{Δ9,12,15}) zugegeben. Nach verschiedenen Zeitpunkten (0 min, 5 min, 1 h, 4 h) nach Zugabe wurden Hefezellen entnommen und die Gesamtlipide durch GC (Fig. 7, links) bzw. die Acyl-CoA-Ester durch HPLC analysiert (Fig. 7, rechts).

- Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl die Produkte von Ot6.1 als auch der Elongase PSE1 bereits zum frühesten Zeitpunkt im Acyl-CoA-Pool gefunden werden. Da für Elongasen die Acyl-CoA-Ester als Substrat dienen (Zank et al. 2002, Plant J, 31:255-268), kann damit gezeigt werden, dass auch die Ot6.1-Desaturase dasselbe Substrat haben muss. Figur 8 fasst dieses Ergebnis zusammen. Während die Verteilung der beiden Acyl-CoA-abhängigen Enzyme OtD6 und PSE1 über die verschiedenen Lipidklassen und Positionen sehr homogen ist, ist dies für die Phospholipid-abhängige Δ 5-Desaturase aus *Phaeodactylum tricornutum* nicht der Fall. Hier kann eine Akkumulation in der sn-2 Position von Phosphatidylcholin demonstriert werden. Wie in Domergue et al. 2002, Eur. J. Biochem. 269, 4105-4113 beschrieben, hat die Δ 5-Desaturase Phosphatidylcholin als Substrat.

Die folgenden Tabelle 6 gibt eine Übersicht über die klonierten *Ostreococcus* Desaturasen wieder:

<u>Ostreococcus tauri</u> Desaturasen							
Name	bp	aa	Homologie	Cyt. B5	His-Box1	His-Box2	His-Box3
OtD4	1611	536	Δ -4-Desaturase	HPGG	HCANH	WRYHHQVSHH	QVEHHLFP
OtD5.1	606	201	Δ -5-Desaturase	-	-	-	QVVHHLFP
OtD5.2	714	237	Δ -5-Desaturase	-	-	WRYHHMVSHH	QIEHHLFP
OtD6.1	1443	457	Δ -6-Desaturase	HPGG	HEGGH	WNSMHNKHH	QVIHHLFP
OtFAD2	1086	361	Δ -12-Desaturase	-	HECGH	WQRSHAVHH	HVAHH

- 15 Beispiel: 16 Klonierung von Expressionsplasmiden zur Samen-spezifischen Expression in Pflanzen

Für die Transformation von Pflanzen wird ein weiterer Transformationsvektor auf Basis von pSUN-USP erzeugt. Dazu werden mittels PCR NotI-Schnittstellen am 5' und 3'-Ende der kodierenden Sequenzen eingefügt. Die entsprechenden Primersequenzen werden von den 5'- und 3-Bereich der Desaturasen abgeleitet.

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

- 5,00 µL Template cDNA
- 5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25mM MgCl₂
- 5,00 µL 2mM dNTP
- 5 1,25 µL je Primer (10 pmol/µL)
- 0,50 µL Advantage-Polymerase

Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.

Reaktionsbedingungen der PCR:

- Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C
- 10 Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C
- Elongationstemperatur: 2 min 72°C
- Anzahl der Zyklen: 35

Die PCR Produkte werden für 16 h bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym NotI inkubiert. Der Pflanzen-Expressionsvektor pSUN300-USP wird in gleicherweise inkubiert.

- 15 Anschliessend werden die PCR Produkte sowie der Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgt mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäss Herstellerangaben. Anschliessend werden Vektor und PCR-Produkte ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Die entstandenen Plasmide
- 20 werden durch Sequenzierung verifiziert.

- pSUN300 ist ein Derivat des Plasmides pPZP (Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P., (1994) The small versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. *Plant Mol Biol* 25:989-994). pSUN-USP entstand aus pSUN300, indem in pSUN300 ein USP-Promotor als EcoRI- Fragment inseriert wurde. Das Polyadenylierungssignal ist das OCS-Gen aus dem *A. tumefaciens* Ti-Plasmid (ocs-Terminator, Genbank Accession V00088) (De Greve, H., Dhaese, P., Seurinck, J., Lemmers, M., Van Montagu, M. and Schell, J. Nucleotide sequence and transcript map of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid-encoded octopine synthase gene *J. Mol. Appl. Genet.* 1 (6), 499-511 (1982). Der USP-Promotor entspricht den Nukleotiden 1 bis 684 (Genbank Accession X56240), wobei ein Teil der nichtcodierenden Region des USP-Gens im Promotor enthalten ist. Das 684 Basenpaar große Promotorfragment wurde mittels käuflichen T7-Standardprimer (Stratagene) und mit Hilfe eines synthetisierten Primers über eine PCR-Reaktion nach Standardmethoden amplifiziert. (Primersequenz: 5'-GTCGACCCGCGGACTAGTGGGCCCTCTAGACCCGGGGGATCC
- 25
 - 30
 - 35 GGATCTGCTGGCTATGAA-3').

Das PCR-Fragment wurde mit EcoRI/Sall nachgeschnitten und in den Vektor pSUN300 mit OCS Terminator eingesetzt. Es entstand das Plasmid mit der Bezeichnung pSUN-USP. Das Konstrukt wurde zur Transformation von *Arabidopsis thaliana*, Raps, Tabak und Leinsamen verwendet.

5 Beispiel: 17 Expression von *Ostreococcus*-Desaturasen in Hefen

Hefen, die wie unter Beispiel 11 mit den Plasmiden pYES2 und pYES2-*Ostreococcus*-Desaturasen transformiert werden, werden folgendermaßen analysiert:

Die Hefezellen aus den Hauptkulturen werden durch Zentrifugation (100 x g, 5 min, 20°C) geerntet und mit 100 mM NaHCO₃, pH 8,0 gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Aus den Hefe-Zellsedimenten werden Fettsäuremethyl-
 10 ester (FAMES) durch saure Methanolyse hergestellt. Hierzu werden die Zellsedimente mit 2 ml 1 N methanolischer Schwefelsäure und 2% (v/v) Dimethoxypropan für 1 h bei 80°C inkubiert. Die Extraktion der FAMES erfolgte durch zweimalige Extraktion mit
 15 Petrolether (PE). Zur Entfernung nicht derivatisierter Fettsäuren werden die organischen Phasen je einmal mit 2 ml 100 mM NaHCO₃, pH 8,0 und 2 ml Aqua dest. gewaschen. Anschließend werden die PE-Phasen mit Na₂SO₄ getrocknet, unter Argon eingedampft und in 100 µl PE aufgenommen. Die Proben werden auf einer DB-23-
 20 Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, Agilent) in einem Hewlett-Packard 6850-Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor getrennt. Die Bedingungen für die GLC-Analyse sind wie folgt: Die Ofentemperatur wird von 50°C bis 250°C mit einer Rate von 5°C/min und schließlich 10 min bei 250°C(halten) programmiert.

Die Identifikation der Signale erfolgt durch Vergleiche der Retentionszeiten mit entsprechenden Fettsäurestandards (Sigma). Die Methodik ist beschrieben zum
 25 Beispiel in Napier and Michaelson, 2001, *Lipids*. 36(8):761-766; Sayanova et al., 2001, *Journal of Experimental Botany*. 52(360):1581-1585, Sperling et al., 2001, *Arch. Biochem. Biophys.* 388(2):293-298 und Michaelson et al., 1998, *FEBS Letters*. 439(3):215-218.

Beispiel: 18 Funktionelle Charakterisierung von Desaturasen aus *Ostreococcus tauri*:

30 Die Substratspezifität von Desaturasen kann nach Expression in Hefe (siehe Beispiele Klonierung von Desaturase-Genen, Hefeexpression) durch die Fütterung mittels verschiedener Hefen ermittelt werden. Beschreibungen für die Bestimmung der einzelnen Aktivitäten finden sich in WO 93/11245 für Δ¹⁵-Desaturasen, WO 94/11516 für Δ¹²-Desaturasen, WO 93/06712, US 5,614,393, US5614393, WO 96/21022,
 35 WO0021557 und WO 99/27111 für Δ⁶-Desaturasen, Qiu et al. 2001, *J. Biol. Chem.* 276, 31561-31566 für Δ⁴-Desaturasen, Hong et al. 2002, *Lipids* 37,863-868 für Δ⁵-Desaturasen.

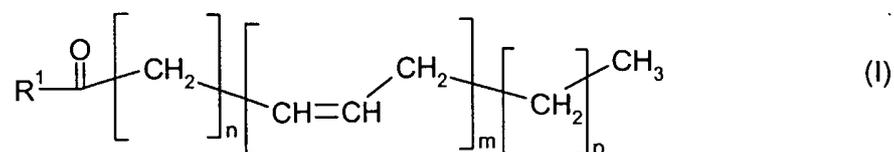
Die Aktivität der einzelnen Desaturasen wird aus der Konversionsrate errechnet nach der Formel $[\text{Substrat}/(\text{Substrat}+\text{Produkt})\cdot 100]$.

Äquivalente:

- 5 Der Fachmann erkennt oder kann viele Äquivalente der hier beschriebenen erfindungsgemäßen spezifischen Ausführungsformen feststellen, indem er lediglich Routineexperimente verwendet. Diese Äquivalente sollen von den Patentansprüchen umfasst sein.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel I

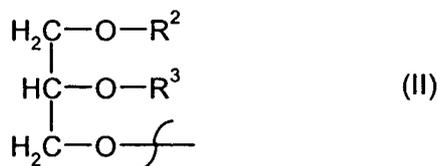


5 in transgenen Organismen mit einem Gehalt von mindestens 1 Gew.-% dieser Verbindungen bezogen auf den Gesamtlipidgehalt des transgenen Organismus, dadurch gekennzeichnet, dass es folgende Verfahrensschritte umfasst:

- a) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, welche für eine Δ -6-Desaturase-Aktivität codiert, und
- 10 b) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, welche für eine Δ -6-Elongase-Aktivität codiert, und
- c) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, welche für eine Δ -5-Desaturase-Aktivität codiert, und
- d) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, welche für eine Δ -5-Elongase-Aktivität codiert, und
- 15 e) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, welche für eine Δ -4-Desaturase-Aktivität codiert, und

wobei die Variablen und Substituenten in der Formel I die folgende Bedeutung haben:

20 $\text{R}^1 =$ Hydroxyl-, CoenzymA-(Thioester), Lyso-Phosphatidylcholin-, Lyso-Phosphatidylethanolamin-, Lyso-Phosphatidylglycerol-, Lyso-Diphosphatidylglycerol-, Lyso-Phosphatidylserin-, Lyso-Phosphatidylinositol-, Sphingobase-, oder einen Rest der allgemeinen Formel II

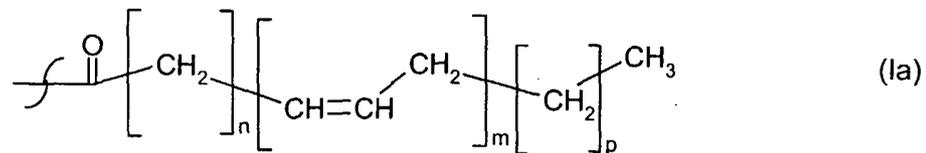


25 $\text{R}^2 =$ Wasserstoff-, Lyso-Phosphatidylcholin-, Lyso-Phosphatidylethanolamin-, Lyso-Phosphatidylglycerol-, Lyso-Diphosphatidylglycerol-, Lyso-

Phosphatidylserin-, Lyso-Phosphatidylinositol- oder gesättigtes oder ungesättigtes C₂-C₂₄-Alkylcarbonyl-,

R³ = Wasserstoff-, gesättigtes oder ungesättigtes C₂-C₂₄-Alkylcarbonyl-, - oder R² oder R³ unabhängig voneinander einen Rest der allgemeinen Formel Ia:

5



n = 2, 3, 4, 5, 6, 7 oder 9, m = 2, 3, 4, 5 oder 6 und p = 0 oder 3.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit Δ-6-Desaturase-, Δ-6-Elongase-, Δ-5-Desaturase-, Δ-5-Elongase- oder Δ-4-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus:
- 10 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 oder SEQ ID NO: 13 dargestellten Sequenz, oder
- 15 b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von den in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 oder SEQ ID NO: 14 dargestellten Aminosäuresequenzen ableiten lassen, oder
- 20 c) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 oder SEQ ID NO: 13 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 oder SEQ ID NO: 14 codieren und eine Δ-6-Desaturase-, Δ-6-Elongase-, Δ-5-Desaturase-, Δ-5-Elongase- oder Δ-4-Desaturaseaktivität aufweisen.
- 25
3. Verfahren nach den Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich in den Organismus eine Nukleinsäuresequenz eingebracht wird, die für Polypeptide mit Δ-12-Desaturaseaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
- 30 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 15 dargestellten Sequenz, oder

- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 16 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- 5 c) Derivate der in SEQ ID NO: 15 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 50 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 16 codieren und eine Δ -12-Desaturasaktivität aufweisen.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Substituenten R^2 oder R^3 unabhängig voneinander gesättigtes oder ungesättigtes C_{18} - C_{22} -Alkylcarbonyl- bedeuten.
- 10 5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Substituenten R^2 oder R^3 unabhängig voneinander ungesättigtes C_{18} -, C_{20} - oder C_{22} -Alkylcarbonyl- mit mindestens zwei Doppelbindungen bedeuten.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass der transgene Organismus ein transgener Mikroorganismus oder eine transgene Pflanze ist.
- 15 7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der transgene Organismus eine Öl-produzierende Pflanze, eine Gemüsepflanze oder Zierpflanze ist.
8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die transgene Organismus eine transgene Pflanze ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzenfamilien: Adelotheceae, Anacardiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Betulaceae, Boraginaceae, Brassicaceae, Bromeliaceae, Caricaceae, Cannabaceae, Convolvulaceae, Chenopodiaceae, Crypthecodiniaceae, Cucurbitaceae, Ditrachaceae, Elaeagnaceae, Ericaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Geraniaceae, Gramineae, Juglandaceae, Lauraceae, Leguminosae, Linaceae oder Prasinophyceae ist.
- 20 9. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindungen der allgemeinen Formel I aus dem Organismus in Form ihrer Öle, Lipide oder freien Fettsäuren isoliert werden.
- 30 10. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindungen der allgemeinen Formel I in einer Konzentration von mindestens 5 Gew.-% bezogenen auf den gesamten Lipidgehalt des transgenen Organismus isoliert werden.
- 35 11. Öl, Lipide oder Fettsäuren oder eine Fraktion davon, hergestellt durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10.

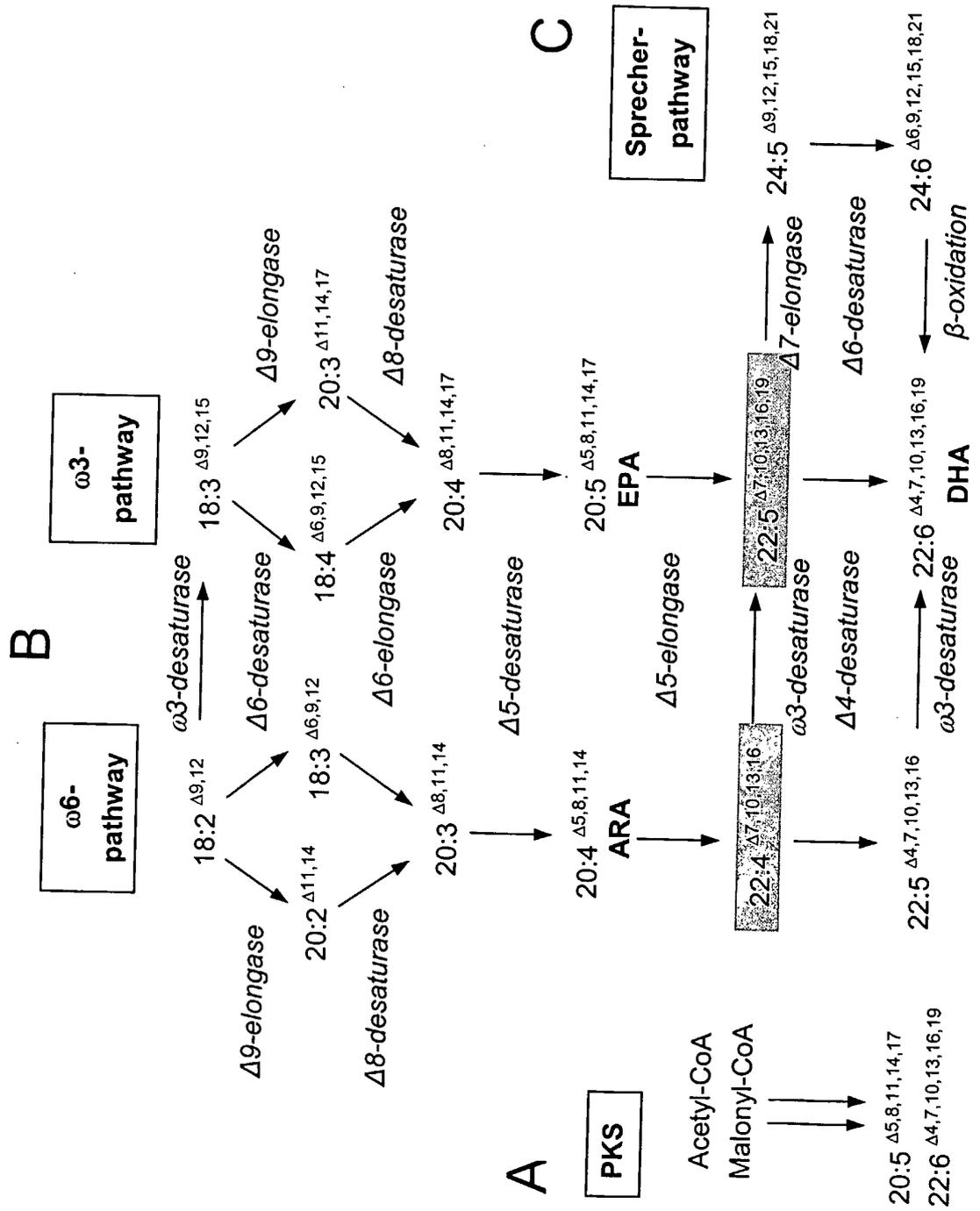
12. Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung, die PUFAs hergestellt nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10 umfasst und von transgenen Pflanzen stammt.
- 5 13. Verfahren zur Herstellung von Ölen, Lipiden oder Fettsäurezusammensetzungen durch Mischen von Öl, Lipide oder Fettsäuren gemäß Anspruch 11 oder Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung gemäß Anspruch 12 mit tierischen Ölen, Lipiden oder Fettsäuren.
- 10 14. Verwendung von Öl, Lipide oder Fettsäuren gemäß Anspruch 11 oder Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung gemäß Anspruch 12 oder Ölen, Lipiden oder Fettsäurezusammensetzungen hergestellt gemäß Anspruch 13 in Futter, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika.
- 15 15. Isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit Δ -6-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:
- 15 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 13 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 14 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- 20 c) Derivate der in SEQ ID NO: 13 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 14 codieren und eine Δ -6-Desaturaseaktivität aufweisen.
- 25 16. Isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit Δ -5-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:
- 25 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 9 oder in SEQ ID NO: 11 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 10 oder in SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- 30 c) Derivate der in SEQ ID NO: 9 oder in SEQ ID NO: 11 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 10 oder in SEQ ID NO: 12 codieren und eine Δ -5-Desaturaseaktivität aufweisen.
- 35 17. Isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit Δ -4-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:

- 5
- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 7 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 8 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 7 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Homologie auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 8 codieren und eine Δ -4-Desaturaseaktivität aufweisen.
- 10
18. Isolierte Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit Δ -12-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 15 dargestellten Sequenz, oder
- 15
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 16 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 15 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 50 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 16 codieren und eine Δ -12-Desaturaseaktivität aufweisen.
- 20
19. Isolierte Nukleinsäuresequenz nach den Ansprüchen 15 bis 18, wobei die Sequenz von einer Alge, einem Pilz, einem Mikroorganismus, einer Pflanze oder einem nicht-humanen Tier stammt.
20. Isolierte Nukleinsäuresequenz nach den Ansprüchen 15 bis 19, wobei die Sequenz aus der Ordnung Salmoniformes, den Diatomeengattungen Thalassiosira oder Crythecodinium oder aus der Familie der Prasinophyceae oder Pythiaceae stammt.
- 25
21. Aminosäuresequenz, die von einer isolierten Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 15 bis 20 codiert wird.
22. Genkonstrukt, enthaltend eine isolierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 15 bis 20, wobei die Nukleinsäure funktionsfähig mit einem oder mehreren Regulationssignalen verbunden ist.
- 30
23. Genkonstrukt nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleinsäurekonstrukt zusätzliche Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels enthält ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym
- 35

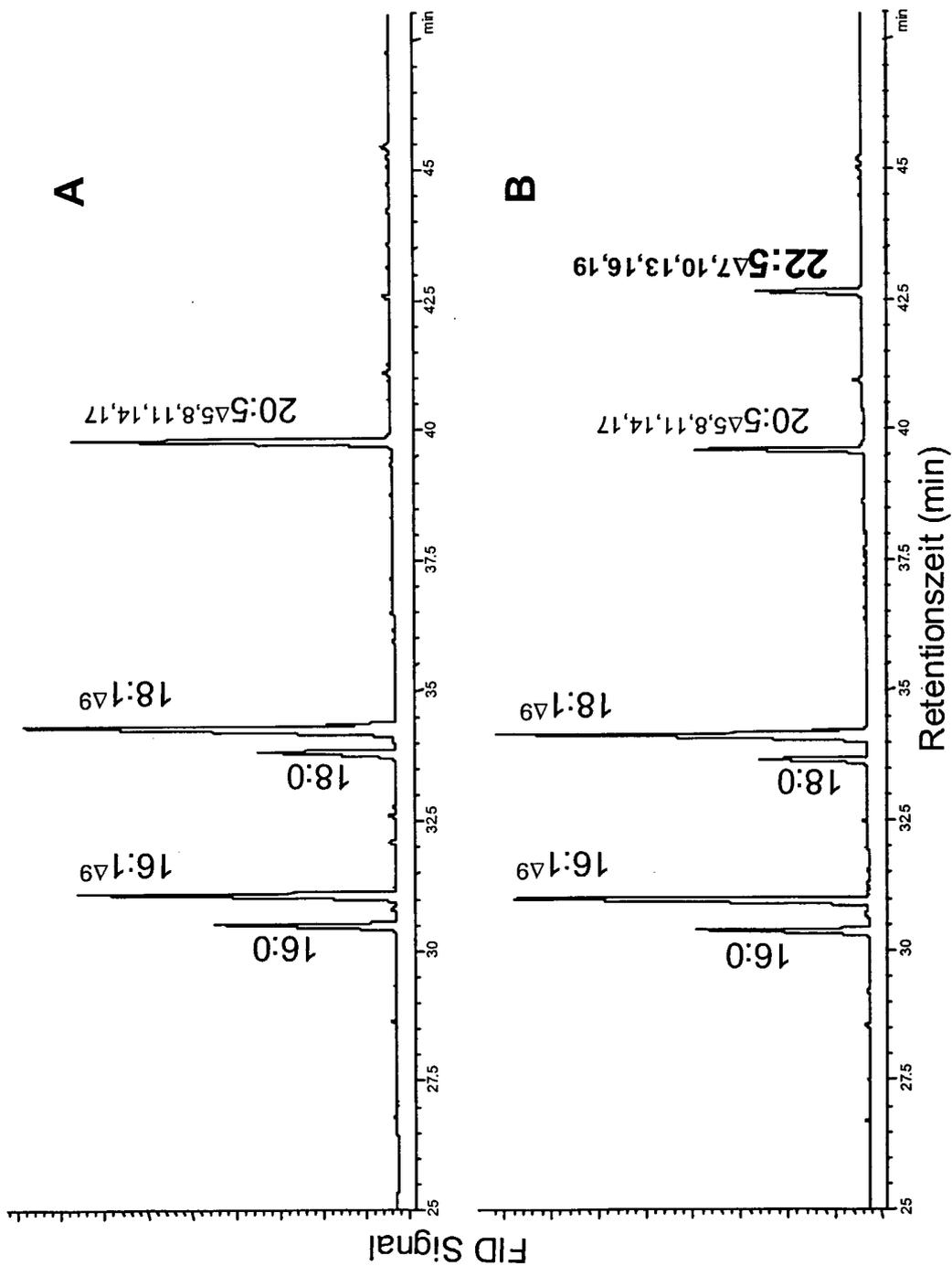
A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylasen, Lipoxygenasen, Triacylglycerol-Lipasen, Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyasen oder Fettsäure-Elongase(n).

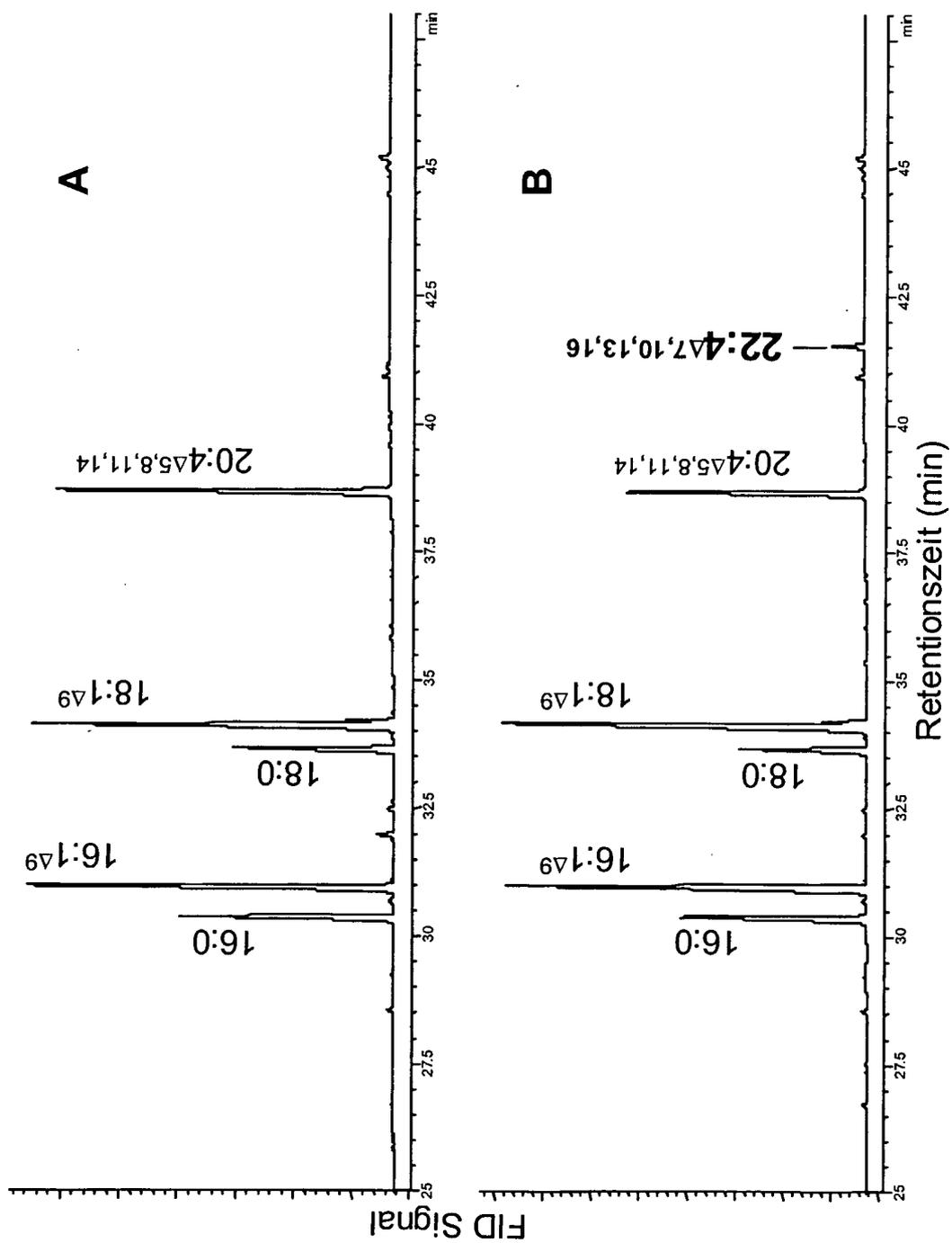
- 5 24. Genkonstrukt nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, dass das Nucleinsäurekonstrukt zusätzliche Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels enthält ausgewählt aus der Gruppe der Δ -4-Desaturase-, Δ -5-Desaturase-, Δ -6-Desaturase-, Δ -9-Desaturase-, Δ -12-Desaturase- oder Δ -6-Elongase.
- 10 25. Vektor, enthaltend eine Nucleinsäure nach den Ansprüchen 15 bis 20 oder ein Genkonstrukt nach Anspruch 22 oder 23.
26. Transgener nicht-humaner Organismus, enthaltend mindestens eine Nucleinsäure nach den Ansprüchen 15 bis 20, ein Genkonstrukt nach Anspruch 22 oder einen Vektor nach Anspruch 25.
- 15 27. Transgener nicht-humaner Organismus nach Anspruch 26, wobei der Organismus ein Mikroorganismus, ein nicht-humanes Tier oder eine Pflanze ist.
28. Transgener nicht-humaner Organismus nach Anspruch 26 oder 27, wobei der Organismus eine Pflanze ist.

Figur 1: Verschiedene Synthesewege zur Biosynthese von DHA (Docosahexaensäure)



Figur 2: Elongation von Eicosapentaensäure durch OtElo1

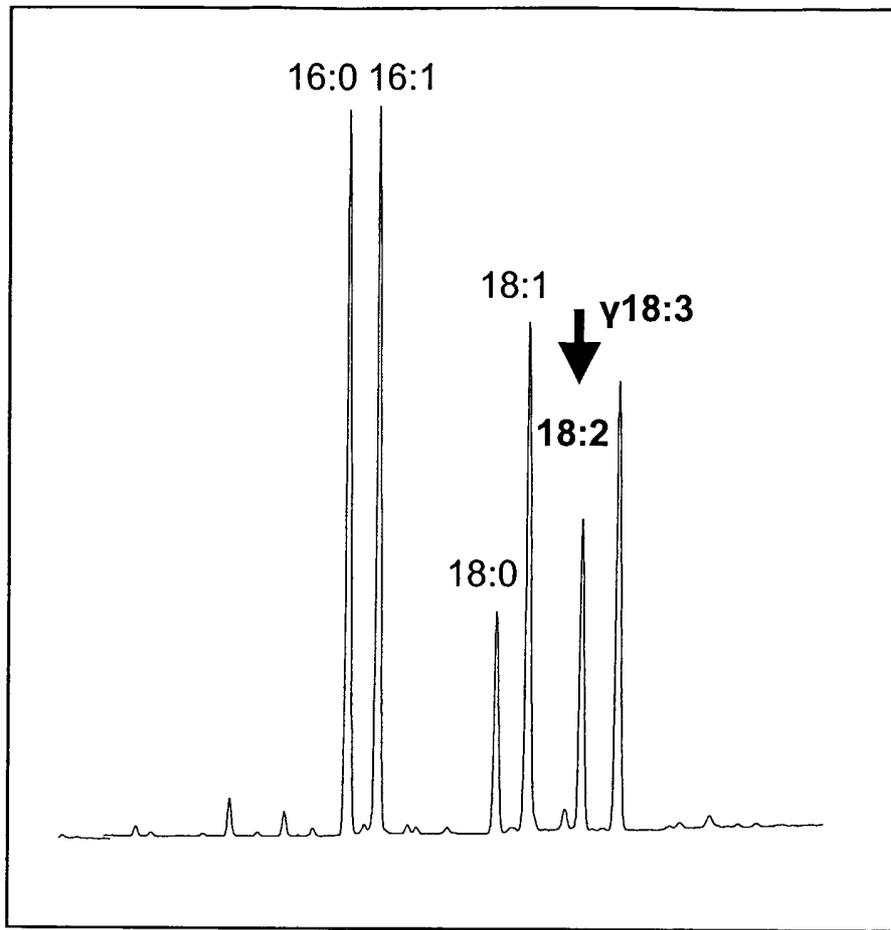




Figur 3: Elongation von Arachidonsäure durch OtElo1

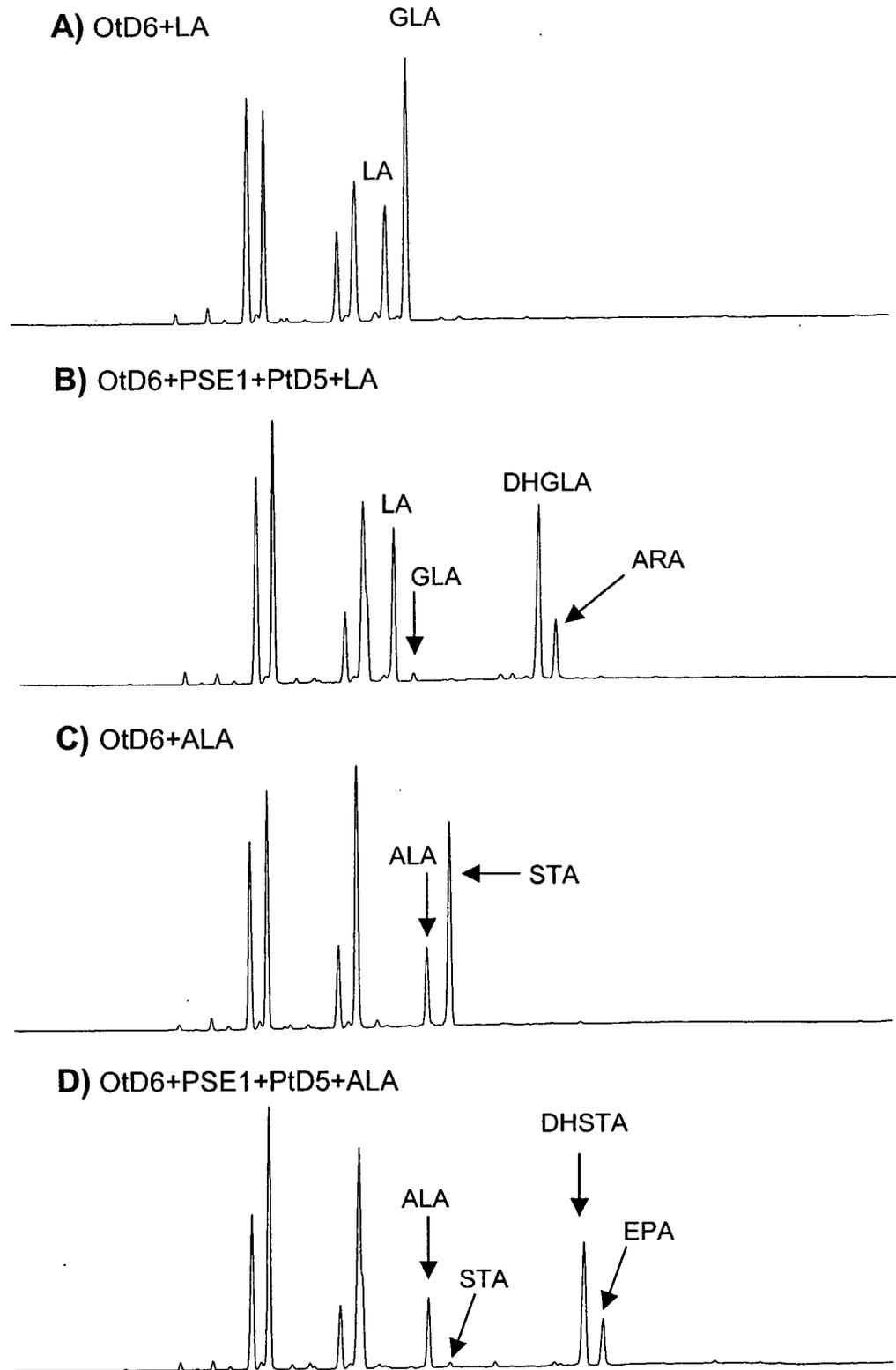
Figur 4: Umsetzung von Linolsäure (Pfeil) zu γ -Linolensäure durch OtDes6.1.

Absorption mAU

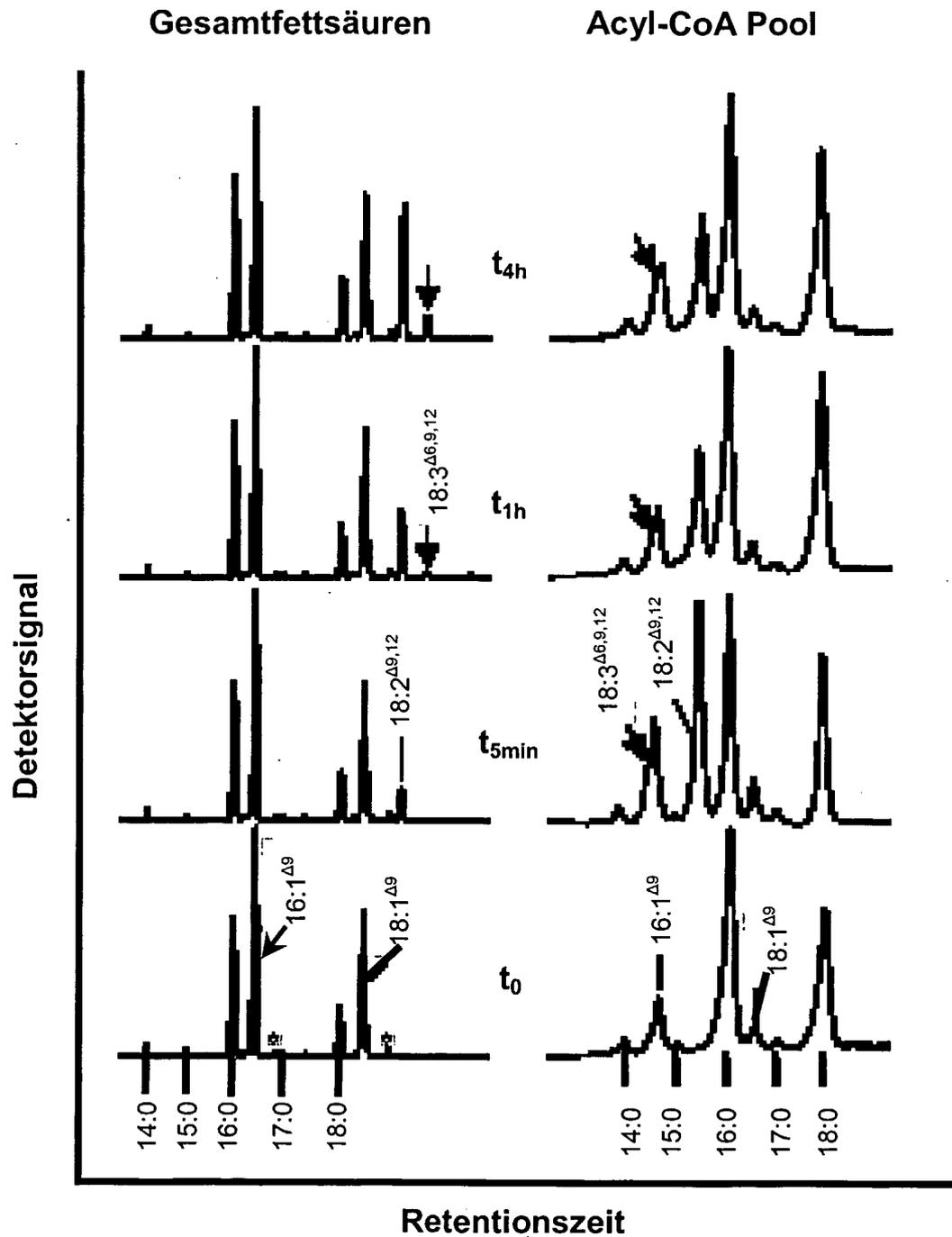


Retentionszeit

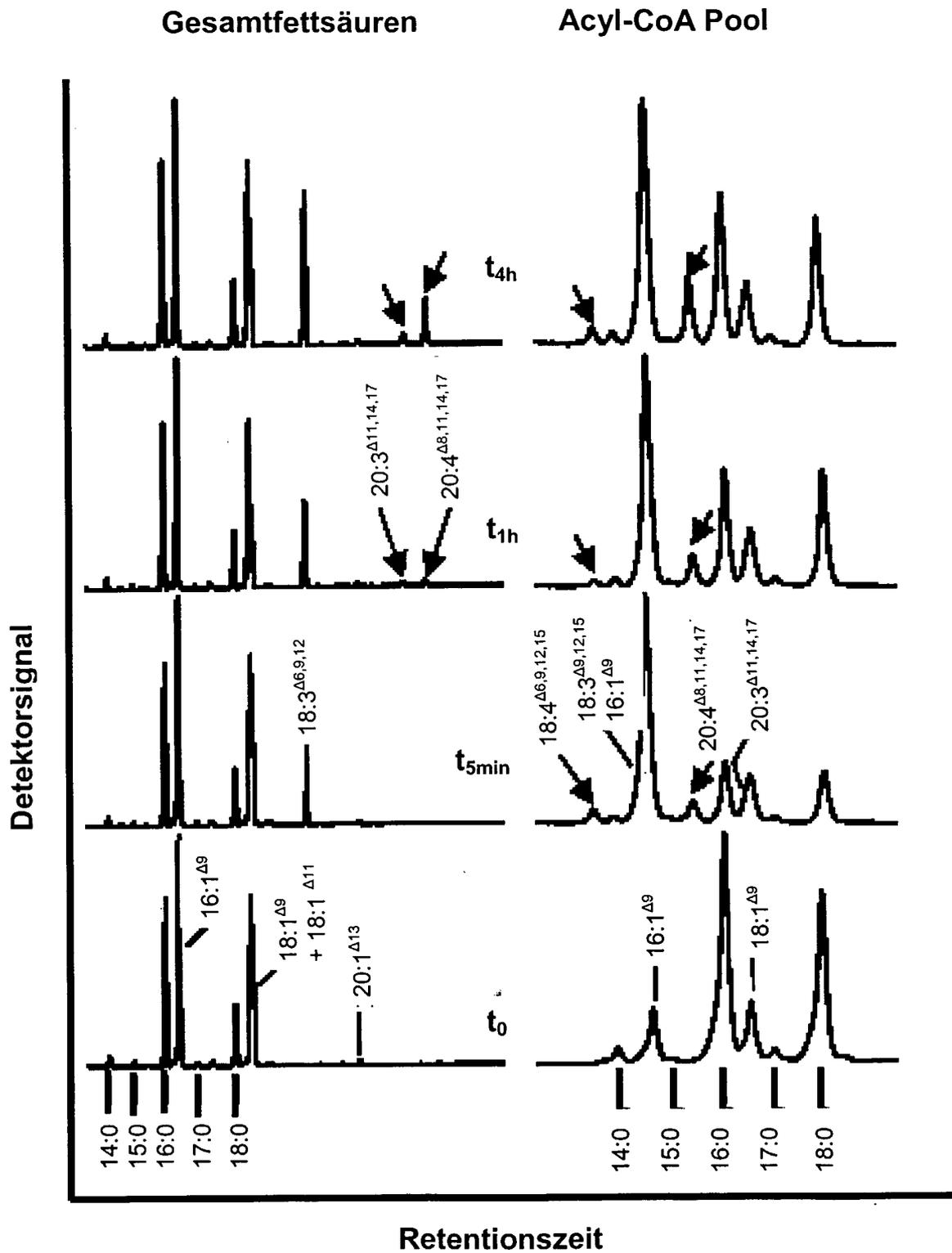
Figur 5: Rekonstitution der Synthese von Arachidonsäure und EPA in Hefe in Gegenwart von OtD6.1, PSE1 und PtD5. Gefüttert wurde mit Linolsäure (LA) bzw. α -Linolensäure (ALA).



Figur 6: Kinetische Analyse der Fettsäureveränderungen in Gesamtlipiden (links) und Acyl-CoA-Ester (rechts) von Hefe-Kulturen, die Ot6.1 exprimieren und mit 18:2^{Δ9,12} supplementiert wurden.



Figur 7: Kinetische Analyse der Fettsäureveränderungen in Gesamtlipiden (links) und Acyl-CoA-Ester (rechts) von Hefe-Kulturen, die Ot6.1 und PSE1 exprimieren und mit 18:3 Δ 9,12,15 supplementiert wurden.



SEQUENCE LISTING

<110> BASF Plant Science GmbH

<120> Verfahren zur Herstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in transgenen Organismen

<130> PF56198

<140> 20040943

<141> 2004-12-23

<160> 16

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 903

<212> DNA

<213> *Ostreococcus tauri*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(903)

<223> Delta-5-Elongase

<400> 1

atg agc gcc tcc ggt gcg ctg ctg ccc gcg atc gcg ttc gcc gcg tac	48
Met Ser Ala Ser Gly Ala Leu Leu Pro Ala Ile Ala Phe Ala Ala Tyr	
1 5 10 15	
gcg tac gcg acg tac gcc tac gcc ttt gag tgg tcg cac gcg aat ggc	96
Ala Tyr Ala Thr Tyr Ala Tyr Ala Phe Glu Trp Ser His Ala Asn Gly	
20 25 30	
atc gac aac gtc gac gcg cgc gag tgg atc ggt gcg ctg tcg ttg agg	144
Ile Asp Asn Val Asp Ala Arg Glu Trp Ile Gly Ala Leu Ser Leu Arg	
35 40 45	
ctc ccg gcg atc gcg acg acg atg tac ctg ttg ttc tgc ctg gtc gga	192
Leu Pro Ala Ile Ala Thr Thr Met Tyr Leu Leu Phe Cys Leu Val Gly	
50 55 60	
ccg agg ttg atg gcg aag cgc gag gcg ttc gac ccg aag ggg ttc atg	240
Pro Arg Leu Met Ala Lys Arg Glu Ala Phe Asp Pro Lys Gly Phe Met	
65 70 75 80	
ctg gcg tac aat gcg tat cag acg gcg ttc aac gtc gtc gtg ctc ggg	288

Leu Ala Tyr Asn Ala Tyr Gln Thr Ala Phe Asn Val Val Val Leu Gly
 85 90 95

atg ttc gcg cga gag atc tcg ggg ctg ggg cag ccc gtg tgg ggg tca 336
 Met Phe Ala Arg Glu Ile Ser Gly Leu Gly Gln Pro Val Trp Gly Ser
 100 105 110

acc atg ccg tgg agc gat aga aaa tcg ttt aag atc ctc ctc ggg gtg 384
 Thr Met Pro Trp Ser Asp Arg Lys Ser Phe Lys Ile Leu Leu Gly Val
 115 120 125

tgg ttg cac tac aac aac caa tat ttg gag cta ttg gac act gtg ttc 432
 Trp Leu His Tyr Asn Asn Gln Tyr Leu Glu Leu Leu Asp Thr Val Phe
 130 135 140

atg gtt gcg cgc aag aag acg aag cag ttg agc ttc ttg cac gtt tat 480
 Met Val Ala Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Ser Phe Leu His Val Tyr
 145 150 155 160

cat cac gcc ctg ttg atc tgg gcg tgg tgg ttg gtg tgt cac ttg atg 528
 His His Ala Leu Leu Ile Trp Ala Trp Trp Leu Val Cys His Leu Met
 165 170 175

gcc acg aac gat tgt atc gat gcc tac ttc gcc gcg gcg tgc aac tcg 576
 Ala Thr Asn Asp Cys Ile Asp Ala Tyr Phe Gly Ala Ala Cys Asn Ser
 180 185 190

ttc att cac atc gtg atg tac tcg tat tat ctc atg tcg gcg ctc ggc 624
 Phe Ile His Ile Val Met Tyr Ser Tyr Tyr Leu Met Ser Ala Leu Gly
 195 200 205

att cga tgc ccg tgg aag cga tac atc acc cag gct caa atg ctc caa 672
 Ile Arg Cys Pro Trp Lys Arg Tyr Ile Thr Gln Ala Gln Met Leu Gln
 210 215 220

ttc gtc att gtc ttc gcg cac gcc gtg ttc gtg ctg cgt cag aag cac 720
 Phe Val Ile Val Phe Ala His Ala Val Phe Val Leu Arg Gln Lys His
 225 230 235 240

tgc ccg gtc acc ctt cct tgg gcg caa atg ttc gtc atg acg aac atg 768
 Cys Pro Val Thr Leu Pro Trp Ala Gln Met Phe Val Met Thr Asn Met
 245 250 255

ctc gtg ctc ttc ggg aac ttc tac ctc aag gcg tac tcg aac aag tcg 816
 Leu Val Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Leu Lys Ala Tyr Ser Asn Lys Ser
 260 265 270

cgc gcc gac ggc gcg agt tcc gtg aaa cca gcc gag acc acg cgc gcg 864
 Arg Gly Asp Gly Ala Ser Ser Val Lys Pro Ala Glu Thr Thr Arg Ala
 275 280 285

ccc agc gtg cga cgc acg cga tct cga aaa att gac taa 903
 Pro Ser Val Arg Arg Thr Arg Ser Arg Lys Ile Asp
 290 295 300

<210> 2

<211> 300

<212> PRT

<213> *Ostreococcus tauri*

<400> 2

Met Ser Ala Ser Gly Ala Leu Leu Pro Ala Ile Ala Phe Ala Ala Tyr
 1 5 10 15

Ala Tyr Ala Thr Tyr Ala Tyr Ala Phe Glu Trp Ser His Ala Asn Gly

<400> 3
atg agt ggc tta cgt gca ccc aac ttt tta cac aga ttc tgg aca aag 48
Met Ser Gly Leu Arg Ala Pro Asn Phe Leu His Arg Phe Trp Thr Lys
1 5 10 15

tgg gac tac gcg att tcc aaa gtc gtc ttc acg tgt gcc gac agt ttt 96
Trp Asp Tyr Ala Ile Ser Lys Val Val Phe Thr Cys Ala Asp Ser Phe
20 25 30

cag tgg gac atc ggg cca gtg agt tcg agt acg gcg cat tta ccc gcc 144
Gln Trp Asp Ile Gly Pro Val Ser Ser Ser Thr Ala His Leu Pro Ala
35 40 45

att gaa tcc cct acc cca ctg gtg act agc ctc ttg ttc tac tta gtc 192
Ile Glu Ser Pro Thr Pro Leu Val Thr Ser Leu Leu Phe Tyr Leu Val
50 55 60

aca gtt ttc ttg tgg tat ggt cgt tta acc agg agt tca gac aag aaa 240
Thr Val Phe Leu Trp Tyr Gly Arg Leu Thr Arg Ser Ser Asp Lys Lys
65 70 75 80

att aga gag cct acg tgg tta aga aga ttc ata ata tgt cat aat gcg 288
Ile Arg Glu Pro Thr Trp Leu Arg Arg Phe Ile Ile Cys His Asn Ala
85 90 95

ttc ttg ata gtc ctc agt ctt tac atg tgc ctt ggt tgt gtg gcc caa 336
Phe Leu Ile Val Leu Ser Leu Tyr Met Cys Leu Gly Cys Val Ala Gln
100 105 110

gcg tat cag aat gga tat act tta tgg ggt aat gaa ttc aag gcc acg 384
Ala Tyr Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Trp Gly Asn Glu Phe Lys Ala Thr
115 120 125

gaa act cag ctt gct ctc tac att tac att ttt tac gta agt aaa ata 432
Glu Thr Gln Leu Ala Leu Tyr Ile Tyr Ile Phe Tyr Val Ser Lys Ile
130 135 140

tac gag ttt gta gat act tac att atg ctt ctc aag aat aac ttg cgg 480
Tyr Glu Phe Val Asp Thr Tyr Ile Met Leu Leu Lys Asn Asn Leu Arg
145 150 155 160

caa gta agt ttc cta cac att tat cac cac agc acg att tcc ttt att 528
Gln Val Ser Phe Leu His Ile Tyr His His Ser Thr Ile Ser Phe Ile
165 170 175

tgg tgg atc att gct cgg agg gct cgg ggt ggt gat gct tac ttc agc 576
Trp Trp Ile Ile Ala Arg Arg Ala Pro Gly Gly Asp Ala Tyr Phe Ser
180 185 190

gcg gcc ttg aac tca tgg gta cac gtg tgc atg tac acc tat tat cta 624
Ala Ala Leu Asn Ser Trp Val His Val Cys Met Tyr Thr Tyr Tyr Leu
195 200 205

tta tca acc ctt att gga aaa gaa gat cct aag cgt tcc aac tac ctt 672
Leu Ser Thr Leu Ile Gly Lys Glu Asp Pro Lys Arg Ser Asn Tyr Leu
210 215 220

tgg tgg ggt cgc cac cta acg caa atg cag atg ctt cag ttt ttc ttc 720
Trp Trp Gly Arg His Leu Thr Gln Met Gln Met Leu Gln Phe Phe Phe
225 230 235 240

aac gta ctt caa gcg ttg tac tgc gct tcg ttc tct acg tat ccc aag 768
Asn Val Leu Gln Ala Leu Tyr Cys Ala Ser Phe Ser Thr Tyr Pro Lys
245 250 255

ttt ttg tcc aaa att ctg ctc gtc tat atg atg agc ctt ctc ggc ttg 816
Phe Leu Ser Lys Ile Leu Leu Val Tyr Met Met Ser Leu Leu Gly Leu
260 265 270

ttt ggg cat ttc tac tat tcc aag cac ata gca gca gct aag ctc cag 864
Phe Gly His Phe Tyr Tyr Ser Lys His Ile Ala Ala Ala Lys Leu Gln

275 280 285 879

aaa aaa cag cag tga
 Lys Lys Gln Gln
 290

<210> 4
 <211> 292
 <212> PRT
 <213> *Ostreococcus tauri*

<400> 4

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

Lys Lys Gln Gln
290

<210> 5

<211> 879

<212> DNA

<213> *Ostreococcus tauri*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(879)

<223> Delta-6-Elongase

<400> 5

atg agt ggc tta cgt gca ccc aac ttt tta cac aga ttc tgg aca aag	48
Met Ser Gly Leu Arg Ala Pro Asn Phe Leu His Arg Phe Trp Thr Lys	
1 5 10 15	
tgg gac tac gcg att tcc aaa gtc gtc ttc acg tgt gcc gac agt ttt	96
Trp Asp Tyr Ala Ile Ser Lys Val Val Phe Thr Cys Ala Asp Ser Phe	
20 25 30	
cag tgg gac atc ggg cca gtg agt tcg agt acg gcg cat tta ccc gcc	144
Gln Trp Asp Ile Gly Pro Val Ser Ser Thr Ala His Leu Pro Ala	
35 40 45	
att gaa tcc cct acc cca ctg gtg act agc ctc ttg ttc tac tta gtc	192
Ile Glu Ser Pro Thr Pro Leu Val Thr Ser Leu Leu Phe Tyr Leu Val	
50 55 60	
aca gtt ttc ttg tgg tat ggt cgt tta acc agg agt tca gac aag aaa	240
Thr Val Phe Leu Trp Tyr Gly Arg Leu Thr Arg Ser Ser Asp Lys Lys	
65 70 75 80	
att aga gag cct acg tgg tta aga aga ttc ata ata tgt cat aat gcg	288
Ile Arg Glu Pro Thr Trp Leu Arg Arg Phe Ile Ile Cys His Asn Ala	
85 90 95	
ttc ttg ata gtc ctc agt ctt tac atg tgc ctt ggt tgt gtg gcc caa	336
Phe Leu Ile Val Leu Ser Leu Tyr Met Cys Leu Gly Cys Val Ala Gln	
100 105 110	
gcg tat cag aat gga tat act tta tgg ggt aat gaa ttc aag gcc acg	384
Ala Tyr Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Trp Gly Asn Glu Phe Lys Ala Thr	
115 120 125	
gaa act cag ctt gct ctc tac att tac att ttt tac gta agt aaa ata	432
Glu Thr Gln Leu Ala Leu Tyr Ile Tyr Ile Phe Tyr Val Ser Lys Ile	
130 135 140	
tac gag ttt gta gat act tac att atg ctt ctc aag aat aac ttg cgg	480
Tyr Glu Phe Val Asp Thr Tyr Ile Met Leu Leu Lys Asn Asn Leu Arg	
145 150 155 160	
caa gta aga ttc cta cac act tat cac cac agc acg att tcc ttt att	528
Gln Val Arg Phe Leu His Thr Tyr His His Ser Thr Ile Ser Phe Ile	
165 170 175	
tgg tgg atc att gct cgg agg gct ccg ggt ggt gat gct tac ttc agc	576
Trp Trp Ile Ile Ala Arg Arg Ala Pro Gly Gly Asp Ala Tyr Phe Ser	
180 185 190	

gcg gcc ttg aac tca tgg gta cac gtg tgc atg tac acc tat tat cta 624
 Ala Ala Leu Asn Ser Trp Val His Val Cys Met Tyr Thr Tyr Tyr Leu
 195 200 205

tta tca acc ctt att gga aaa gaa gat cct aag cgt tcc aac tac ctt 672
 Leu Ser Thr Leu Ile Gly Lys Glu Asp Pro Lys Arg Ser Asn Tyr Leu
 210 215 220

tgg tgg ggt cgc cac cta acg caa atg cag atg ctt cag ttt ttc ttc 720
 Trp Trp Gly Arg His Leu Thr Gln Met Gln Met Leu Gln Phe Phe Phe
 225 230 235 240

aac gta ctt caa gcg ttg tac tgc gct tgc ttc tct acg tat ccc aag 768
 Asn Val Leu Gln Ala Leu Tyr Cys Ala Ser Phe Ser Thr Tyr Pro Lys
 245 250 255

ttt ttg tcc aaa att ctg ctc gtc tat atg atg agc ctt ctc ggc ttg 816
 Phe Leu Ser Lys Ile Leu Leu Val Tyr Met Met Ser Leu Leu Gly Leu
 260 265 270

ttt ggg cat ttc tac tat tcc aag cac ata gca gca gct aag ctc cag 864
 Phe Gly His Phe Tyr Tyr Ser Lys His Ile Ala Ala Ala Lys Leu Gln
 275 280 285

aaa aaa cag cag tga 879
 Lys Lys Gln Gln
 290

<210> 6

<211> 292

<212> PRT

<213> *Ostreococcus tauri*

<400> 6

Met Ser Gly Leu Arg Ala Pro Asn Phe Leu His Arg Phe Trp Thr Lys
 1 5 10 15

Trp Asp Tyr Ala Ile Ser Lys Val Val Phe Thr Cys Ala Asp Ser Phe
 20 25 30

Gln Trp Asp Ile Gly Pro Val Ser Ser Ser Thr Ala His Leu Pro Ala
 35 40 45

Ile Glu Ser Pro Thr Pro Leu Val Thr Ser Leu Leu Phe Tyr Leu Val
 50 55 60

Thr Val Phe Leu Trp Tyr Gly Arg Leu Thr Arg Ser Ser Asp Lys Lys
 65 70 75 80

Ile Arg Glu Pro Thr Trp Leu Arg Arg Phe Ile Ile Cys His Asn Ala
 85 90 95

Phe Leu Ile Val Leu Ser Leu Tyr Met Cys Leu Gly Cys Val Ala Gln
 100 105 110

Ala Tyr Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Trp Gly Asn Glu Phe Lys Ala Thr
 115 120 125

Glu Thr Gln Leu Ala Leu Tyr Ile Tyr Ile Phe Tyr Val Ser Lys Ile
 130 135 140

Tyr Glu Phe Val Asp Thr Tyr Ile Met Leu Leu Lys Asn Asn Leu Arg
 145 150 155 160

Gln Val Arg Phe Leu His Thr Tyr His His Ser Thr Ile Ser Phe Ile
 165 170 175
 Trp Trp Ile Ile Ala Arg Arg Ala Pro Gly Gly Asp Ala Tyr Phe Ser
 180 185 190
 Ala Ala Leu Asn Ser Trp Val His Val Cys Met Tyr Thr Tyr Tyr Leu
 195 200 205
 Leu Ser Thr Leu Ile Gly Lys Glu Asp Pro Lys Arg Ser Asn Tyr Leu
 210 215 220
 Trp Trp Gly Arg His Leu Thr Gln Met Gln Met Leu Gln Phe Phe Phe
 225 230 235 240
 Asn Val Leu Gln Ala Leu Tyr Cys Ala Ser Phe Ser Thr Tyr Pro Lys
 245 250 255
 Phe Leu Ser Lys Ile Leu Leu Val Tyr Met Met Ser Leu Leu Gly Leu
 260 265 270
 Phe Gly His Phe Tyr Tyr Ser Lys His Ile Ala Ala Ala Lys Leu Gln
 275 280 285
 Lys Lys Gln Gln
 290

<210> 7

<211> 1611

<212> DNA

<213> *Ostreococcus tauri*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1611)

<223> Delta-4-Desaturase

<400> 7

atg tac ctc gga cgc ggc cgt ctc gag agc ggg acg acg cga ggg atg	48
Met Tyr Leu Gly Arg Gly Arg Leu Glu Ser Gly Thr Thr Arg Gly Met	
1 5 10 15	
atg cgg acg cac gcg cgg cga ccg tcg acg acg tog aat ccg tgc gcg	96
Met Arg Thr His Ala Arg Arg Pro Ser Thr Thr Ser Asn Pro Cys Ala	
20 25 30	
cgg tca cgc gtg cgt aag acg acg gag cga tcg ctc gcg cga gtg cga	144
Arg Ser Arg Val Arg Lys Thr Thr Glu Arg Ser Leu Ala Arg Val Arg	
35 40 45	
cga tcg acg agt gag aag gga agc gcg ctc gtg ctc gag cga gag agc	192
Arg Ser Thr Ser Glu Lys Gly Ser Ala Leu Val Leu Glu Arg Glu Ser	
50 55 60	
gaa cgg gag aag gag gag gga ggg aaa gtc cga gcg gag gga ttg cga	240
Glu Arg Glu Lys Glu Glu Gly Gly Lys Ala Arg Ala Glu Gly Leu Arg	
65 70 75 80	
ttc caa cgc ccg gac gtc gcc gcg ccg ggg gga gcg gat cct tgg aac	288
Phe Gln Arg Pro Asp Val Ala Ala Pro Gly Gly Ala Asp Pro Trp Asn	
85 90 95	

gac gag aag tgg aca aag acc aag tgg acg gta ttc aga gac gtc gcg	336
Asp Glu Lys Trp Thr Lys Thr Lys Trp Thr Val Phe Arg Asp Val Ala	
100 105 110	
tac gat ctc gat cct ttc ttc gct cga cac ccc gga gga gac tgg ctc	384
Tyr Asp Leu Asp Pro Phe Phe Ala Arg His Pro Gly Gly Asp Trp Leu	
115 120 125	
ctg aac ttg gcc gtg gga cga gac tgc acc gcg ctc atc gaa tcc tat	432
Leu Asn Leu Ala Val Gly Arg Asp Cys Thr Ala Leu Ile Glu Ser Tyr	
130 135 140	
cac ttg cga cca gag gtg gcg acg gct cgt ttc aga atg ctg ccc aaa	480
His Leu Arg Pro Glu Val Ala Thr Ala Arg Phe Arg Met Leu Pro Lys	
145 150 155 160	
ctc gag gat ttt ccc gtc gag gcc gtg ccc aag tcc ccg aga ccg aac	528
Leu Glu Asp Phe Pro Val Glu Ala Val Pro Lys Ser Pro Arg Pro Asn	
165 170 175	
gat tcg ccg tta tac aac aac att cgc aac cga gtc cgc gaa gag ctc	576
Asp Ser Pro Leu Tyr Asn Asn Ile Arg Asn Arg Val Arg Glu Glu Leu	
180 185 190	
ttc cca gag gag gga aag aat atg cac aga cag ggc ggc gac cac ggc	624
Phe Pro Glu Glu Gly Lys Asn Met His Arg Gln Gly Gly Asp His Gly	
195 200 205	
gac ggt gac gat tct ggg ttt cgc cgc ctt ttg ctt atg ccg tgt acc	672
Asp Gly Asp Asp Ser Gly Phe Arg Arg Leu Leu Leu Met Pro Cys Thr	
210 215 220	
tat tcc ctt ccg ggg gtt cct ttc cgg ctg cct cct cgg gtc tcg cgg	720
Tyr Ser Leu Pro Gly Val Pro Phe Arg Leu Pro Pro Arg Val Ser Arg	
225 230 235 240	
ggg cgt gga ttg gtc tca cga ttc agg cac tgc gcc aac cac ggc gcg	768
Gly Arg Gly Leu Val Ser Arg Phe Arg His Cys Ala Asn His Gly Ala	
245 250 255	
atg tct cct tcg ccg gcc gtt aac ggc gtc ctc ggt ttg acg aac gat	816
Met Ser Pro Ser Pro Ala Val Asn Gly Val Leu Gly Leu Thr Asn Asp	
260 265 270	
ctc atc ggc ggc tcg tcc ttg atg tgg aga tat cac cac caa gtc agc	864
Leu Ile Gly Gly Ser Ser Leu Met Trp Arg Tyr His His Gln Val Ser	
275 280 285	
cac cac att cat tgc aac gac aac gcc atg gat caa gac gtg tac acg	912
His His Ile His Cys Asn Asp Asn Ala Met Asp Gln Asp Val Tyr Thr	
290 295 300	
gcg atg cca tta ttg cgt ttc gac gct cgc cgg ccc aag tcc tgg tac	960
Ala Met Pro Leu Leu Arg Phe Asp Ala Arg Arg Pro Lys Ser Trp Tyr	
305 310 315 320	
cat cgc ttc cag cag tgg tac atg ttt tta gcg ttc ccg ttg ttg cag	1008
His Arg Phe Gln Gln Trp Tyr Met Phe Leu Ala Phe Pro Leu Leu Gln	
325 330 335	
gtt gcc ttc caa gtc gga gac att gcc gca ctg ttc acg cgt gat acc	1056
Val Ala Phe Gln Val Gly Asp Ile Ala Ala Leu Phe Thr Arg Asp Thr	
340 345 350	
gaa ggc gct aag ctt cac ggg gcg acg acg tgg gag ctt acc acg gtt	1104
Glu Gly Ala Lys Leu His Gly Ala Thr Thr Trp Glu Leu Thr Thr Val	
355 360 365	
gtc ctc ggt aag att gtg cac ttc ggt ctt ttg ttg ggg ccg ttg atg	1152
Val Leu Gly Lys Ile Val His Phe Gly Leu Leu Leu Gly Pro Leu Met	
370 375 380	
aac cac gcg gtg agt tct gtt ttg ctg ggg atc gtc ggt ttc atg gcg	1200

Asn His Ala Val Ser Ser Val Leu Leu Gly Ile Val Gly Phe Met Ala
 385 390 395 400

tgc caa ggt ata gtt ctg gcg tgc acg ttt gct gtg agt cac aat gtc 1248
 Cys Gln Gly Ile Val Leu Ala Cys Thr Phe Ala Val Ser His Asn Val
 405 410 415

gcg gag gcg aag ata cct gag gac acc gga gga gaa gcc tgg gag aga 1296
 Ala Glu Ala Lys Ile Pro Glu Asp Thr Gly Gly Glu Ala Trp Glu Arg
 420 425 430

gat tgg ggt gtc cag cag ttg gtg act agc gcc gac tgg ggt gga aag 1344
 Asp Trp Gly Val Gln Gln Leu Val Thr Ser Ala Asp Trp Gly Gly Lys
 435 440 445

ata ggt aac ttc ttc acg ggt ggc ctc aac ttg caa gtt gag cac cac 1392
 Ile Gly Asn Phe Phe Thr Gly Gly Leu Asn Leu Gln Val Glu His His
 450 455 460

ttg ttt ccg gcg att tgc ttc gtc cac tac ccg gac atc gcg aag atc 1440
 Leu Phe Pro Ala Ile Cys Phe Val His Tyr Pro Asp Ile Ala Lys Ile
 465 470 475 480

gtg aag gaa gaa gcg gcc aag ctc aac atc cct tac gcg tct tac agg 1488
 Val Lys Glu Glu Ala Ala Lys Leu Asn Ile Pro Tyr Ala Ser Tyr Arg
 485 490 495

act ctt cct ggt att ttc gtc caa ttc tgg aga ttt atg aag gac atg 1536
 Thr Leu Pro Gly Ile Phe Val Gln Phe Trp Arg Phe Met Lys Asp Met
 500 505 510

ggc acg gct gag caa att ggt gaa gtt cca ttg ccg aag att ccc aac 1584
 Gly Thr Ala Glu Gln Ile Gly Glu Val Pro Leu Pro Lys Ile Pro Asn
 515 520 525

ccg cag ctc gcg ccg aag ctc gct tag 1611
 Pro Gln Leu Ala Pro Lys Leu Ala
 530 535

<210> 8

<211> 536

<212> PRT

<213> *Ostreococcus tauri*

<400> 8

Met Tyr Leu Gly Arg Gly Arg Leu Glu Ser Gly Thr Thr Arg Gly Met
 1 5 10 15

Met Arg Thr His Ala Arg Arg Pro Ser Thr Thr Ser Asn Pro Cys Ala
 20 25 30

Arg Ser Arg Val Arg Lys Thr Thr Glu Arg Ser Leu Ala Arg Val Arg
 35 40 45

Arg Ser Thr Ser Glu Lys Gly Ser Ala Leu Val Leu Glu Arg Glu Ser
 50 55 60

Glu Arg Glu Lys Glu Glu Gly Gly Lys Ala Arg Ala Glu Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Phe Gln Arg Pro Asp Val Ala Ala Pro Gly Gly Ala Asp Pro Trp Asn
 85 90 95

Asp Glu Lys Trp Thr Lys Thr Lys Trp Thr Val Phe Arg Asp Val Ala
 100 105 110

Tyr Asp Leu Asp Pro Phe Phe Ala Arg His Pro Gly Gly Asp Trp Leu
 115 120 125
 Leu Asn Leu Ala Val Gly Arg Asp Cys Thr Ala Leu Ile Glu Ser Tyr
 130 135 140
 His Leu Arg Pro Glu Val Ala Thr Ala Arg Phe Arg Met Leu Pro Lys
 145 150 155 160
 Leu Glu Asp Phe Pro Val Glu Ala Val Pro Lys Ser Pro Arg Pro Asn
 165 170 175
 Asp Ser Pro Leu Tyr Asn Asn Ile Arg Asn Arg Val Arg Glu Glu Leu
 180 185 190
 Phe Pro Glu Glu Gly Lys Asn Met His Arg Gln Gly Gly Asp His Gly
 195 200 205
 Asp Gly Asp Asp Ser Gly Phe Arg Arg Leu Leu Leu Met Pro Cys Thr
 210 215 220
 Tyr Ser Leu Pro Gly Val Pro Phe Arg Leu Pro Pro Arg Val Ser Arg
 225 230 235 240
 Gly Arg Gly Leu Val Ser Arg Phe Arg His Cys Ala Asn His Gly Ala
 245 250 255
 Met Ser Pro Ser Pro Ala Val Asn Gly Val Leu Gly Leu Thr Asn Asp
 260 265 270
 Leu Ile Gly Gly Ser Ser Leu Met Trp Arg Tyr His His Gln Val Ser
 275 280 285
 His His Ile His Cys Asn Asp Asn Ala Met Asp Gln Asp Val Tyr Thr
 290 295 300
 Ala Met Pro Leu Leu Arg Phe Asp Ala Arg Arg Pro Lys Ser Trp Tyr
 305 310 315 320
 His Arg Phe Gln Gln Trp Tyr Met Phe Leu Ala Phe Pro Leu Leu Gln
 325 330 335
 Val Ala Phe Gln Val Gly Asp Ile Ala Ala Leu Phe Thr Arg Asp Thr
 340 345 350
 Glu Gly Ala Lys Leu His Gly Ala Thr Thr Trp Glu Leu Thr Thr Val
 355 360 365
 Val Leu Gly Lys Ile Val His Phe Gly Leu Leu Leu Gly Pro Leu Met
 370 375 380
 Asn His Ala Val Ser Ser Val Leu Leu Gly Ile Val Gly Phe Met Ala
 385 390 395 400
 Cys Gln Gly Ile Val Leu Ala Cys Thr Phe Ala Val Ser His Asn Val
 405 410 415
 Ala Glu Ala Lys Ile Pro Glu Asp Thr Gly Gly Glu Ala Trp Glu Arg
 420 425 430
 Asp Trp Gly Val Gln Gln Leu Val Thr Ser Ala Asp Trp Gly Gly Lys
 435 440 445
 Ile Gly Asn Phe Phe Thr Gly Gly Leu Asn Leu Gln Val Glu His His
 450 455 460
 Leu Phe Pro Ala Ile Cys Phe Val His Tyr Pro Asp Ile Ala Lys Ile
 465 470 475 480
 Val Lys Glu Glu Ala Ala Lys Leu Asn Ile Pro Tyr Ala Ser Tyr Arg
 485 490 495

Thr Leu Pro Gly Ile Phe Val Gln Phe Trp Arg Phe Met Lys Asp Met
 500 505 510

Gly Thr Ala Glu Gln Ile Gly Glu Val Pro Leu Pro Lys Ile Pro Asn
 515 520 525

Pro Gln Leu Ala Pro Lys Leu Ala
 530 535

<210> 9

<211> 606

<212> DNA

<213> *Ostreococcus tauri*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(606)

<223> Delta-5-Desaturase

<400> 9

atg tac ggt ttg cta tcg ctc aag tcg tgc ttc gtc gac gat ttc aac 48
 Met Tyr Gly Leu Leu Ser Leu Lys Ser Cys Phe Val Asp Asp Phe Asn
 1 5 10 15

gcc tac ttc tcc gga cgc atc ggc tgg gtc aag gtg atg aag ttc acc 96
 Ala Tyr Phe Ser Gly Arg Ile Gly Trp Val Lys Val Met Lys Phe Thr
 20 25 30

cgc ggc gag gcg atc gca ttt tgg ggc acc aag ctc ttg tgg gcc gcg 144
 Arg Gly Glu Ala Ile Ala Phe Trp Gly Thr Lys Leu Leu Trp Ala Ala
 35 40 45

tat tac ctc gcg ttg ccg cta aag atg tcg cat cgg ccg ctc gga gaa 192
 Tyr Tyr Leu Ala Leu Pro Leu Lys Met Ser His Arg Pro Leu Gly Glu
 50 55 60

ctc ctc gca ctc tgg gcc gtc acc gag ttc gtc acc gga tgg ctg ttg 240
 Leu Leu Ala Leu Trp Ala Val Thr Glu Phe Val Thr Gly Trp Leu Leu
 65 70 75 80

gcg ttc atg ttc caa gtc gcc cac gtc gtc ggc gag gtt cac ttc ttc 288
 Ala Phe Met Phe Gln Val Ala His Val Val Gly Glu Val His Phe Phe
 85 90 95

acc ctc gac gcg aag aac cgc gtg aac ttg gga tgg gga gag gca cag 336
 Thr Leu Asp Ala Lys Asn Arg Val Asn Leu Gly Trp Gly Glu Ala Gln
 100 105 110

ctc atg tcg agc gcg gat ttc gcc cac gga tcc aag ttt tgg acg cac 384
 Leu Met Ser Ser Ala Asp Phe Ala His Gly Ser Lys Phe Trp Thr His
 115 120 125

ttc tcc gga ggc tta aac tac caa gtc gtc cac cat ctc ttc ccg ggc 432
 Phe Ser Gly Gly Leu Asn Tyr Gln Val Val His His Leu Phe Pro Gly
 130 135 140

gtc tgc cac gtg cac tat ccc gcg ctc gcg cca att att aag gcg gca 480
 Val Cys His Val His Tyr Pro Ala Leu Ala Pro Ile Ile Lys Ala Ala
 145 150 155 160

gct gag aag cac ggc ctc cac tac cag att tac ccc acg ttt tgg tcc 528

Ala Glu Lys His Gly Leu His Tyr Gln Ile Tyr Pro Thr Phe Trp Ser
165 170 175

gcc ctg cgc gcg cac ttc cgg cac ctc gcc aac gtc ggc cgc gcc gcg 576
Ala Leu Arg Ala His Phe Arg His Leu Ala Asn Val Gly Arg Ala Ala
180 185 190

tac gta ccg tcc ctc caa acc gtc gga tga 606

Tyr Val Pro Ser Leu Gln Thr Val Gly
195 200

<210> 10

<211> 201

<212> PRT

<213> *Ostreococcus tauri*

<400> 10

Met Tyr Gly Leu Leu Ser Leu Lys Ser Cys Phe Val Asp Asp Phe Asn
1 5 10 15

Ala Tyr Phe Ser Gly Arg Ile Gly Trp Val Lys Val Met Lys Phe Thr
20 25 30

Arg Gly Glu Ala Ile Ala Phe Trp Gly Thr Lys Leu Leu Trp Ala Ala
35 40 45

Tyr Tyr Leu Ala Leu Pro Leu Lys Met Ser His Arg Pro Leu Gly Glu
50 55 60

Leu Leu Ala Leu Trp Ala Val Thr Glu Phe Val Thr Gly Trp Leu Leu
65 70 75 80

Ala Phe Met Phe Gln Val Ala His Val Val Gly Glu Val His Phe Phe
85 90 95

Thr Leu Asp Ala Lys Asn Arg Val Asn Leu Gly Trp Gly Glu Ala Gln
100 105 110

Leu Met Ser Ser Ala Asp Phe Ala His Gly Ser Lys Phe Trp Thr His
115 120 125

Phe Ser Gly Gly Leu Asn Tyr Gln Val Val His His Leu Phe Pro Gly
130 135 140

Val Cys His Val His Tyr Pro Ala Leu Ala Pro Ile Ile Lys Ala Ala
145 150 155 160

Ala Glu Lys His Gly Leu His Tyr Gln Ile Tyr Pro Thr Phe Trp Ser
165 170 175

Ala Leu Arg Ala His Phe Arg His Leu Ala Asn Val Gly Arg Ala Ala
180 185 190

Tyr Val Pro Ser Leu Gln Thr Val Gly
195 200

<210> 11

<211> 714

<212> DNA

<213> *Ostreococcus tauri*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(714)

<223> Delta-5-Desaturase

<400> 11

atg	gtg	agc	cat	cac	tcg	tac	tgt	aac	gac	gcg	gat	ttg	gat	cag	gat	48
Met	Val	Ser	His	His	Ser	Tyr	Cys	Asn	Asp	Ala	Asp	Leu	Asp	Gln	Asp	
1				5					10					15		
gtg	tac	acc	gca	ctg	ccg	ctc	ctg	cgc	ctg	gac	ccg	tct	cag	gag	ttg	96
Val	Tyr	Thr	Ala	Leu	Pro	Leu	Leu	Arg	Leu	Asp	Pro	Ser	Gln	Glu	Leu	
			20					25					30			
aag	tgg	ttt	cat	cga	tac	cag	gcg	ttt	tac	gcc	ccg	ctc	atg	tgg	ccg	144
Lys	Trp	Phe	His	Arg	Tyr	Gln	Ala	Phe	Tyr	Ala	Pro	Leu	Met	Trp	Pro	
		35					40					45				
ttt	ttg	tgg	ctc	gcg	gcg	cag	ttt	ggc	gac	gcg	cag	aac	atc	ctg	atc	192
Phe	Leu	Trp	Leu	Ala	Ala	Gln	Phe	Gly	Asp	Ala	Gln	Asn	Ile	Leu	Ile	
	50					55					60					
gac	cga	gcg	tcg	ccg	ggc	gtc	gcg	tac	aag	gga	ttg	atg	gcg	aac	gag	240
Asp	Arg	Ala	Ser	Pro	Gly	Val	Ala	Tyr	Lys	Gly	Leu	Met	Ala	Asn	Glu	
65					70					75				80		
gtc	gcg	ctg	tac	ggt	ctc	ggt	aag	ggt	tta	cac	ttt	ggt	ctt	ctc	ctc	288
Val	Ala	Leu	Tyr	Val	Leu	Gly	Lys	Val	Leu	His	Phe	Gly	Leu	Leu	Leu	
				85					90					95		
ggc	ggt	cct	gcg	tac	ttg	cac	gga	ttg	tcc	aac	gcg	atc	ggt	cca	ttc	336
Gly	Val	Pro	Ala	Tyr	Leu	His	Gly	Leu	Ser	Asn	Ala	Ile	Val	Pro	Phe	
			100					105					110			
ttg	gcg	tac	ggc	gca	ttc	ggc	tcc	ttc	gtc	ctg	tgc	tgg	ttc	ttc	atc	384
Leu	Ala	Tyr	Gly	Ala	Phe	Gly	Ser	Phe	Val	Leu	Cys	Trp	Phe	Phe	Ile	
		115					120					125				
gtc	agc	cat	aac	ctc	gaa	gcg	ctg	aca	ccc	ggt	aac	ctt	aac	aag	tcc	432
Val	Ser	His	Asn	Leu	Glu	Ala	Leu	Thr	Pro	Val	Asn	Leu	Asn	Lys	Ser	
	130					135					140					
acg	aag	aac	gac	tgg	ggg	gcg	tgg	cag	atc	gag	aca	tcg	gcg	tct	tgg	480
Thr	Lys	Asn	Asp	Trp	Gly	Ala	Trp	Gln	Ile	Glu	Thr	Ser	Ala	Ser	Trp	
145					150					155					160	
ggc	aac	gcg	ttc	tgg	agc	ttc	ttc	tct	gga	ggt	ctg	aac	ctg	caa	atc	528
Gly	Asn	Ala	Phe	Trp	Ser	Phe	Phe	Ser	Gly	Gly	Leu	Asn	Leu	Gln	Ile	
			165						170					175		
gag	cac	cac	ctc	ttc	ccg	ggc	atg	gcg	cac	aac	ctg	tac	ccg	aag	atg	576
Glu	His	His	Leu	Phe	Pro	Gly	Met	Ala	His	Asn	Leu	Tyr	Pro	Lys	Met	
			180					185					190			
gtg	ccg	atc	atc	aag	gac	gag	tgt	gcg	aaa	gcg	ggc	ggt	cgc	tac	acc	624
Val	Pro	Ile	Ile	Lys	Asp	Glu	Cys	Ala	Lys	Ala	Gly	Val	Arg	Tyr	Thr	
		195					200					205				
ggt	tac	ggt	ggc	tac	acc	ggc	ctg	ctc	ccg	atc	acc	cgc	gac	atg	ttc	672
Gly	Tyr	Gly	Gly	Tyr	Thr	Gly	Leu	Leu	Pro	Ile	Thr	Arg	Asp	Met	Phe	
	210					215					220					
tcc	tac	ctc	cat	aag	tgt	ggc	cga	acg	gcg	aaa	cta	gcc	taa			714
Ser	Tyr	Leu	His	Lys	Cys	Gly	Arg	Thr	Ala	Lys	Leu	Ala				
225					230					235						

<210> 12

<211> 237

<212> PRT

<213> *Ostreococcus tauri*

<400> 12

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

<210> 13

<211> 1371

<212> DNA

<213> *Ostreococcus tauri*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1371)

<223> Delta-6-Desaturase

<400> 13

atg tgc gtg gag acg gaa aat aac gat ggg atc ccc acg gtg gag atc	48
Met Cys Val Glu Thr Glu Asn Asn Asp Gly Ile Pro Thr Val Glu Ile	
1 5 10 15	
gcg ttc gac ggt gag cgc gag cgg gcg gag gca aac gtg aag ctg tcc	96
Ala Phe Asp Gly Glu Arg Glu Arg Ala Glu Ala Asn Val Lys Leu Ser	
20 25 30	
gcg gag aag atg gag ccg gcg gcg ctg gcg aag acg ttc gcg agg cgg	144
Ala Glu Lys Met Glu Pro Ala Ala Leu Ala Lys Thr Phe Ala Arg Arg	
35 40 45	
tac gtc gtg atc gag ggg gtg gag tac gat gtg acg gat ttt aag cac	192
Tyr Val Val Ile Glu Gly Val Glu Tyr Asp Val Thr Asp Phe Lys His	
50 55 60	
ccg gga gga acg gtt att ttc tat gcg ttg tca aac acc ggg gcg gac	240
Pro Gly Gly Thr Val Ile Phe Tyr Ala Leu Ser Asn Thr Gly Ala Asp	
65 70 75 80	
gcg acg gaa gcg ttc aag gag ttt cat cat cgg tcg aga aag gcg agg	288
Ala Thr Glu Ala Phe Lys Glu Phe His His Arg Ser Arg Lys Ala Arg	
85 90 95	
aaa gcc ttg gcg gcg ctc ccg tct cga ccg gcc aag acg gcc aag gtg	336
Lys Ala Leu Ala Ala Leu Pro Ser Arg Pro Ala Lys Thr Ala Lys Val	
100 105 110	
gac gac gcg gag atg ctc caa gat ttc gcc aag tgg cgg aaa gaa ttg	384
Asp Asp Ala Glu Met Leu Gln Asp Phe Ala Lys Trp Arg Lys Glu Leu	
115 120 125	
gag aga gat gga ttc ttc aag ccc tct ccg gcg cac gtg gcg tat cgc	432
Glu Arg Asp Gly Phe Phe Lys Pro Ser Pro Ala His Val Ala Tyr Arg	
130 135 140	
ttc gcc gag ctc gcg gcg atg tac gct ctc ggg acg tac ctg atg tac	480
Phe Ala Glu Leu Ala Ala Met Tyr Ala Leu Gly Thr Tyr Leu Met Tyr	
145 150 155 160	
gct cga tac gtc gtc tcc tcg gtg ctc gtg tac gct tgc ttt ttc ggc	528
Ala Arg Tyr Val Val Ser Ser Val Leu Val Tyr Ala Cys Phe Phe Gly	
165 170 175	
gcc cga tgc ggt tgg gtg cag cac gag ggc gga cac agc tcg ctg acg	576
Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His Glu Gly Gly His Ser Ser Leu Thr	
180 185 190	
ggc aac att tgg tgg gac aag cgc atc cag gcc ttc aca gcc ggg ttc	624
Gly Asn Ile Trp Trp Asp Lys Arg Ile Gln Ala Phe Thr Ala Gly Phe	
195 200 205	
ggt ctc gcc ggt agc ggc gac atg tgg aac tcg atg cac aac aag cat	672
Gly Leu Ala Gly Ser Gly Asp Met Trp Asn Ser Met His Asn Lys His	
210 215 220	
cac gcg acg cct caa aag gtt cgt cac gac atg gat ctg gac acc acc	720
His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg His Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr	
225 230 235 240	
ccc gcg gtg gcg ttc ttc aac acc gcg gtg gaa gac aat cgt ccc cgt	768
Pro Ala Val Ala Phe Phe Asn Thr Ala Val Glu Asp Asn Arg Pro Arg	

										245				250				255				
ggc	ttt	agc	aag	tac	tgg	ttg	cgc	ctt	ctc	cag	gcg	tgg	acc	ttc	atc	ccc		816				
Gly	Phe	Ser	Lys	Tyr	Trp	Leu	Arg	Leu	Gln	Ala	Trp	Thr	Phe	Ile	Pro							
			260					265					270									
gtg	acg	tcc	ggc	ttg	gtg	ctc	ctt	ttc	tgg	atg	ttt	ttc	ctc	cac	ccc		864					
Val	Thr	Ser	Gly	Leu	Val	Leu	Leu	Phe	Trp	Met	Phe	Phe	Leu	His	Pro							
		275					280					285										
tcc	aag	gct	ttg	aag	ggt	ggc	aag	tac	gaa	gag	ttg	gtg	tgg	atg	ctc		912					
Ser	Lys	Ala	Leu	Lys	Gly	Gly	Lys	Tyr	Glu	Glu	Leu	Val	Trp	Met	Leu							
	290					295					300											
gcc	gcg	cac	gtc	atc	cgc	acg	tgg	acg	atc	aag	gcg	gtg	acc	gga	ttc		960					
Ala	Ala	His	Val	Ile	Arg	Thr	Trp	Thr	Ile	Lys	Ala	Val	Thr	Gly	Phe							
305					310					315					320							
acc	gcg	atg	cag	tcc	tac	ggc	tta	ttt	ttg	gcg	acg	agc	tgg	gtg	agc		1008					
Thr	Ala	Met	Gln	Ser	Tyr	Gly	Leu	Phe	Leu	Ala	Thr	Ser	Trp	Val	Ser							
			325						330					335								
ggc	tgc	tat	ctg	ttt	gca	cac	ttc	tcc	acg	tcg	cac	acg	cac	ctg	gat		1056					
Gly	Cys	Tyr	Leu	Phe	Ala	His	Phe	Ser	Thr	Ser	His	Thr	His	Leu	Asp							
			340					345					350									
gtg	gtg	ccc	gcg	gac	gag	cat	ctc	tcc	tgg	ggt	cga	tac	gcc	gtc	gat		1104					
Val	Val	Pro	Ala	Asp	Glu	His	Leu	Ser	Trp	Val	Arg	Tyr	Ala	Val	Asp							
		355					360					365										
cac	acg	atc	gac	atc	gat	ccg	agt	caa	ggt	tgg	gtg	aac	tgg	ttg	atg		1152					
His	Thr	Ile	Asp	Ile	Asp	Pro	Ser	Gln	Gly	Trp	Val	Asn	Trp	Leu	Met							
	370					375					380											
ggc	tac	ctc	aac	tgc	caa	gtc	atc	cac	cac	ctc	ttt	ccg	agc	atg	ccg		1200					
Gly	Tyr	Leu	Asn	Cys	Gln	Val	Ile	His	His	Leu	Phe	Pro	Ser	Met	Pro							
385					390					395					400							
cag	ttc	cgc	cag	ccc	gag	gta	tct	cgc	cgc	ttc	gtc	gcc	ttt	gcg	aaa		1248					
Gln	Phe	Arg	Gln	Pro	Glu	Val	Ser	Arg	Arg	Phe	Val	Ala	Phe	Ala	Lys							
				405					410					415								
aag	tgg	aac	ctc	aac	tac	aag	gtc	atg	acc	tac	gcc	ggt	gcg	tgg	aag		1296					
Lys	Trp	Asn	Leu	Asn	Tyr	Lys	Val	Met	Thr	Tyr	Ala	Gly	Ala	Trp	Lys							
			420					425					430									
gca	acg	ctc	gga	aac	ctc	gac	aac	gtg	ggt	aag	cac	tac	tac	gtg	cac		1344					
Ala	Thr	Leu	Gly	Asn	Leu	Asp	Asn	Val	Gly	Lys	His	Tyr	Tyr	Val	His							
			435				440					445										
ggc	caa	cac	tcc	gga	aag	acg	gcg	taa									1371					
Gly	Gln	His	Ser	Gly	Lys	Thr	Ala															
	450					455																
<210>	14																					
<211>	456																					
<212>	PRT																					
<213>	Ostreococcus tauri																					
<400>	14																					
Met	Cys	Val	Glu	Thr	Glu	Asn	Asn	Asp	Gly	Ile	Pro	Thr	Val	Glu	Ile							
1				5					10					15								

Ala Phe Asp Gly Glu Arg Glu Arg Ala Glu Ala Asn Val Lys Leu Ser
 20 25 30
 Ala Glu Lys Met Glu Pro Ala Ala Leu Ala Lys Thr Phe Ala Arg Arg
 35 40 45
 Tyr Val Val Ile Glu Gly Val Glu Tyr Asp Val Thr Asp Phe Lys His
 50 55 60
 Pro Gly Gly Thr Val Ile Phe Tyr Ala Leu Ser Asn Thr Gly Ala Asp
 65 70 75 80
 Ala Thr Glu Ala Phe Lys Glu Phe His His Arg Ser Arg Lys Ala Arg
 85 90 95
 Lys Ala Leu Ala Ala Leu Pro Ser Arg Pro Ala Lys Thr Ala Lys Val
 100 105 110
 Asp Asp Ala Glu Met Leu Gln Asp Phe Ala Lys Trp Arg Lys Glu Leu
 115 120 125
 Glu Arg Asp Gly Phe Phe Lys Pro Ser Pro Ala His Val Ala Tyr Arg
 130 135 140
 Phe Ala Glu Leu Ala Ala Met Tyr Ala Leu Gly Thr Tyr Leu Met Tyr
 145 150 155 160
 Ala Arg Tyr Val Val Ser Ser Val Leu Val Tyr Ala Cys Phe Phe Gly
 165 170 175
 Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His Glu Gly Gly His Ser Ser Leu Thr
 180 185 190
 Gly Asn Ile Trp Trp Asp Lys Arg Ile Gln Ala Phe Thr Ala Gly Phe
 195 200 205
 Gly Leu Ala Gly Ser Gly Asp Met Trp Asn Ser Met His Asn Lys His
 210 215 220
 His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg His Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr
 225 230 235 240
 Pro Ala Val Ala Phe Phe Asn Thr Ala Val Glu Asp Asn Arg Pro Arg
 245 250 255
 Gly Phe Ser Lys Tyr Trp Leu Arg Leu Gln Ala Trp Thr Phe Ile Pro
 260 265 270
 Val Thr Ser Gly Leu Val Leu Leu Phe Trp Met Phe Phe Leu His Pro
 275 280 285
 Ser Lys Ala Leu Lys Gly Gly Lys Tyr Glu Glu Leu Val Trp Met Leu
 290 295 300
 Ala Ala His Val Ile Arg Thr Trp Thr Ile Lys Ala Val Thr Gly Phe
 305 310 315 320
 Thr Ala Met Gln Ser Tyr Gly Leu Phe Leu Ala Thr Ser Trp Val Ser
 325 330 335
 Gly Cys Tyr Leu Phe Ala His Phe Ser Thr Ser His Thr His Leu Asp
 340 345 350
 Val Val Pro Ala Asp Glu His Leu Ser Trp Val Arg Tyr Ala Val Asp
 355 360 365
 His Thr Ile Asp Ile Asp Pro Ser Gln Gly Trp Val Asn Trp Leu Met
 370 375 380
 Gly Tyr Leu Asn Cys Gln Val Ile His His Leu Phe Pro Ser Met Pro
 385 390 395 400

Gln Phe Arg Gln Pro Glu Val Ser Arg Arg Phe Val Ala Phe Ala Lys
 405 410 415
 Lys Trp Asn Leu Asn Tyr Lys Val Met Thr Tyr Ala Gly Ala Trp Lys
 420 425 430
 Ala Thr Leu Gly Asn Leu Asp Asn Val Gly Lys His Tyr Tyr Val His
 435 440 445
 Gly Gln His Ser Gly Lys Thr Ala
 450 455

<210> 15

<211> 1086

<212> DNA

<213> *Ostreococcus tauri*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1086)

<223> Delta-12-Desaturase

<400> 15

atg cag gag ggg gtg cga aac att ccg aac gag tgc ttt gag acg gga	48
Met Gln Glu Gly Val Arg Asn Ile Pro Asn Glu Cys Phe Glu Thr Gly	
1 5 10 15	
cat ctt gaa aga ccc tgg cgt tcc ggc cgg tgt ggg cgc gat ccc ggt	96
His Leu Glu Arg Pro Trp Arg Ser Gly Arg Cys Gly Arg Asp Pro Gly	
20 25 30	
tcg aat tgg ggc gct ggc ttc cgc ttt ttt tcg ctc aag ggg ttt tgg	144
Ser Asn Trp Gly Ala Gly Phe Arg Phe Phe Ser Leu Lys Gly Phe Trp	
35 40 45	
tgg ccg gcg tgg tgg gcg tac gcg ttc gtg acg ggg acg gcg gcc act	192
Trp Pro Ala Trp Trp Ala Tyr Ala Phe Val Thr Gly Thr Ala Ala Thr	
50 55 60	
ggg tgt tgg gtc gcc gcg cac gag tgc ggg cac ggc gcg ttc agc gat	240
Gly Cys Trp Val Ala Ala His Glu Cys Gly His Gly Ala Phe Ser Asp	
65 70 75 80	
aac aag acg ttg caa gat gcg gtt gga tac gtg ttg cac tcg ttg ctc	288
Asn Lys Thr Leu Gln Asp Ala Val Gly Tyr Val Leu His Ser Leu Leu	
85 90 95	
ttg gtg ccg tac ttt tct tgg cag cga tca cac gcg gtg cat cac tcg	336
Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Gln Arg Ser His Ala Val His His Ser	
100 105 110	
agg acg aat cac gtt ctt gag ggc gag acg cac gtg ccg gcg cgc ttg	384
Arg Thr Asn His Val Leu Glu Gly Glu Thr His Val Pro Ala Arg Leu	
115 120 125	
ggg acg gaa gac gcc aac gtc gtg ttc aag ctt cgc gaa ttg atc ggt	432
Gly Thr Glu Asp Ala Asn Val Val Phe Lys Leu Arg Glu Leu Ile Gly	
130 135 140	
gaa ggg ccg ttc acg ttt ttc aac ctc gtc ggc gtc ttc gcg ctc gga	480

Glu Gly Pro Phe Thr Phe Phe Asn Leu Val Gly Val Phe Ala Leu Gly
 145 150 155 160

tgg ccg att tac ttg ctc acc ggc gcg agc ggc gga ccg gtg cgc ggt 528
 Trp Pro Ile Tyr Leu Leu Thr Gly Ala Ser Gly Gly Pro Val Arg Gly
 165 170 175

aac acg aac cac ttc tta ccc ttc atg ggc gag aaa ggt aag cac gcg 576
 Asn Thr Asn His Phe Leu Pro Phe Met Gly Glu Lys Gly Lys His Ala
 180 185 190

ctg ttc ccg ggt aag tgg gcg aag aag gtg tgg cag tct gac atc ggc 624
 Leu Phe Pro Gly Lys Trp Ala Lys Lys Val Trp Gln Ser Asp Ile Gly
 195 200 205

gtt gtt gcc gtc ctg ggc gcg ctc gcg gct tgg gcg gcg cac agc ggg 672
 Val Val Ala Val Leu Gly Ala Leu Ala Ala Trp Ala Ala His Ser Gly
 210 215 220

att gcc aca gtg atg gca ctc tac gtc ggc ccg tac atg gtg acc aac 720
 Ile Ala Thr Val Met Ala Leu Tyr Val Gly Pro Tyr Met Val Thr Asn
 225 230 235 240

ttt tgg ctc gtc ttg tac acg tgg tta cag cac acc gac gtt gac gtg 768
 Phe Trp Leu Val Tyr Thr Trp Leu Gln His Thr Asp Val Asp Val
 245 250 255

ccg cac ttc gag ggc gac gat tgg aac ttg gtc aag ggg gca ttc atg 816
 Pro His Phe Glu Gly Asp Asp Trp Asn Leu Val Lys Gly Ala Phe Met
 260 265 270

acg atc gat cgc ccg tac ggc cca gtt ttt gat ttc ttg cac cac cgc 864
 Thr Ile Asp Arg Pro Tyr Gly Pro Val Phe Asp Phe Leu His His Arg
 275 280 285

atc gcc agc acg cac gtc gcg cac cac atc aac aca cca ttc ccg cat 912
 Ile Gly Ser Thr His Val Ala His His Ile Asn Thr Pro Phe Pro His
 290 295 300

tac aag gct caa atg gcg acg gat gcg cta aag gag gcg tat ccc gac 960
 Tyr Lys Ala Gln Met Ala Thr Asp Ala Leu Lys Glu Ala Tyr Pro Asp
 305 310 315 320

ctc tac ctt tac gat cca act ccg atc gcg acc gct acg tgg cgc gtg 1008
 Leu Tyr Leu Tyr Asp Pro Thr Pro Ile Ala Thr Ala Thr Trp Arg Val
 325 330 335

ggg agc aag tgc atc gcc gtc gtg aag aag gga gac gaa tgg gtg ttc 1056
 Gly Ser Lys Cys Ile Ala Val Val Lys Lys Gly Asp Glu Trp Val Phe
 340 345 350

acg gat aag caa ctc ccg gtc gcg gcg tga 1086
 Thr Asp Lys Gln Leu Pro Val Ala Ala
 355 360

<210> 16

<211> 361

<212> PRT

<213> *Ostreococcus tauri*

<400> 16

Met Gln Glu Gly Val Arg Asn Ile Pro Asn Glu Cys Phe Glu Thr Gly
 1 5 10 15

His Leu Glu Arg Pro Trp Arg Ser Gly Arg Cys Gly Arg Asp Pro Gly
 20 25 30

Ser Asn Trp Gly Ala Gly Phe Arg Phe Phe Ser Leu Lys Gly Phe Trp
 35 40 45
 Trp Pro Ala Trp Trp Ala Tyr Ala Phe Val Thr Gly Thr Ala Ala Thr
 50 55 60
 Gly Cys Trp Val Ala Ala His Glu Cys Gly His Gly Ala Phe Ser Asp
 65 70 75 80
 Asn Lys Thr Leu Gln Asp Ala Val Gly Tyr Val Leu His Ser Leu Leu
 85 90 95
 Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Gln Arg Ser His Ala Val His His Ser
 100 105 110
 Arg Thr Asn His Val Leu Glu Gly Glu Thr His Val Pro Ala Arg Leu
 115 120 125
 Gly Thr Glu Asp Ala Asn Val Val Phe Lys Leu Arg Glu Leu Ile Gly
 130 135 140
 Glu Gly Pro Phe Thr Phe Phe Asn Leu Val Gly Val Phe Ala Leu Gly
 145 150 155 160
 Trp Pro Ile Tyr Leu Leu Thr Gly Ala Ser Gly Gly Pro Val Arg Gly
 165 170 175
 Asn Thr Asn His Phe Leu Pro Phe Met Gly Glu Lys Gly Lys His Ala
 180 185 190
 Leu Phe Pro Gly Lys Trp Ala Lys Lys Val Trp Gln Ser Asp Ile Gly
 195 200 205
 Val Val Ala Val Leu Gly Ala Leu Ala Ala Trp Ala Ala His Ser Gly
 210 215 220
 Ile Ala Thr Val Met Ala Leu Tyr Val Gly Pro Tyr Met Val Thr Asn
 225 230 235 240
 Phe Trp Leu Val Leu Tyr Thr Trp Leu Gln His Thr Asp Val Asp Val
 245 250 255
 Pro His Phe Glu Gly Asp Asp Trp Asn Leu Val Lys Gly Ala Phe Met
 260 265 270
 Thr Ile Asp Arg Pro Tyr Gly Pro Val Phe Asp Phe Leu His His Arg
 275 280 285
 Ile Gly Ser Thr His Val Ala His His Ile Asn Thr Pro Phe Pro His
 290 295 300
 Tyr Lys Ala Gln Met Ala Thr Asp Ala Leu Lys Glu Ala Tyr Pro Asp
 305 310 315 320
 Leu Tyr Leu Tyr Asp Pro Thr Pro Ile Ala Thr Ala Thr Trp Arg Val
 325 330 335
 Gly Ser Lys Cys Ile Ala Val Val Lys Lys Gly Asp Glu Trp Val Phe
 340 345 350
 Thr Asp Lys Gln Leu Pro Val Ala Ala
 355 360

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2005/013803

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/82 C12N9/02 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)
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)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/071467 A (E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY; KINNEY, ANTHONY, J; CAHOON, EDGA) 26 August 2004 (2004-08-26) example 13	1-10
Y	----- MEYER A ET AL: "NOVEL FATTY ACID ELONGASES AND THEIR USE FOR THE RECONSTITUTION OF DOCOSAHEXAENOIC ACID BIOSYNTHESIS" JOURNAL OF LIPID RESEARCH, BETHESDA, MD, US, vol. 45, no. 10, October 2004 (2004-10), pages 1899-1909, XP009046591 ISSN: 0022-2275 page 1908 figure 1 ----- -/--	1-10

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family 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

9 March 2006

Date of mailing of the international search report

08.05.2006

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

Bucka, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2005/013803

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>NAPIER JOHNATHAN A ET AL: "Progress toward the production of long-chain polyunsaturated fatty acids in transgenic plants" LIPIDS, vol. 39, no. 11, November 2004 (2004-11), pages 1067-1075, XP008061222 ISSN: 0024-4201 page 1069, right-hand column - page 1070, left-hand column; figure 1 page 1073, right-hand column</p>	1-10
Y	<p>NAPIER J A ET AL: "The production of long chain polyunsaturated fatty acids in transgenic plants by reverse-engineering" BIOCHIMIE, MASSON, PARIS, FR, vol. 86, no. 11, November 2004 (2004-11), pages 785-792, XP004689087 ISSN: 0300-9084 figure 1 page 791</p>	1-10
A	<p>ABBADI A ET AL: "Transgenic oilseeds as sustainable source of nutritionally relevant C20 and C22 polyunsaturated fatty acids?" EUROPEAN JOURNAL OF LIPID SCIENCE AND TECHNOLOGY, WILEY VCH VERLAG, WEINHEIM, DE, vol. 103, no. 2, February 2001 (2001-02), pages 106-113, XP002228744 ISSN: 1438-7697 figure 1</p>	1-10
A	<p>WO 03/093482 A (BASF PLANT SCIENCE GMBH; CIRPUS, PETRA; RENZ, ANDREAS; LERCHL, JENS; K) 13 November 2003 (2003-11-13) the whole document</p>	1-10
A	<p>DREXLER H ET AL: "Metabolic engineering of fatty acids for breeding of new oilseed crops: strategies, problems and first results" JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY, FISCHER, STUTTGART, DE, vol. 160, no. 7, 2003, pages 779-802, XP004955255 ISSN: 0176-1617 page 794, right-hand column - page 796, right-hand column; figure 6</p>	1-10
P,X	<p>WO 2005/012316 A (BASF PLANT SCIENCE GMBH; ZANK, THORSTEN; BAUER, JOERG; CIRPUS, PETRA;) 10 February 2005 (2005-02-10) page 6 - page 15; claim 1</p>	1-10

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2005/013803

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 2005/083093 A (BASF PLANT SCIENCE GMBH; CIRPUS, PETRA; BAUER, JOERG; QIU, XIAO; WU, G) 9 September 2005 (2005-09-09) page 8 - page 16; claim 1 -----	1-10
P,X	WO 2005/083053 A (BASF PLANT SCIENCE GMBH; CIRPUS, PETRA; BAUER, JOERG; ZANK, THORSTEN;) 9 September 2005 (2005-09-09) claims 1,2 -----	1-10
P,X	ROBERT STAN S ET AL: "Metabolic engineering of Arabidopsis to produce nutritionally important DHA in seed oil" FUNCTIONAL PLANT BIOLOGY, vol. 32, no. 6, 2005, pages 473-479, XP008061225 ISSN: 1445-4408 figure 1; table 1 -----	1-10
P,X	WU GUOHAI ET AL: "Stepwise engineering to produce high yields of very long-chain polyunsaturated fatty acids in plants" NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 23, no. 8, August 2005 (2005-08), pages 1013-1017, XP007900180 ISSN: 1087-0156 figure 1; table 1 -----	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2005/013803

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004071467 A	26-08-2004	BR PI0406688 A	04-04-2006
		CA 2512589 A1	26-08-2004
		EP 1592392 A2	09-11-2005

WO 03093482 A	13-11-2003	AU 2003232512 A1	17-11-2003
		CA 2485060 A1	13-11-2003
		DE 10219203 A1	13-11-2003
		EP 1501932 A2	02-02-2005

WO 2005012316 A	10-02-2005	CA 2533613 A1	10-02-2005

WO 2005083093 A	09-09-2005	NONE	

WO 2005083053 A	09-09-2005	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/013803

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. C12N15/82 C12N9/02 A01H5/00		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) 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) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search, EMBL		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 2004/071467 A (E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY; KINNEY, ANTHONY, J; CAHOON, EDGA) 26. August 2004 (2004-08-26) Beispiel 13	1-10
Y	----- MEYER A ET AL: "NOVEL FATTY ACID ELONGASES AND THEIR USE FOR THE RECONSTITUTION OF DOCOSAHEXAENOIC ACID BIOSYNTHESIS" JOURNAL OF LIPID RESEARCH, BETHESDA, MD, US, Bd. 45, Nr. 10, Oktober 2004 (2004-10), Seiten 1899-1909, XP009046591 ISSN: 0022-2275 Seite 1908 Abbildung 1 ----- -/--	1-10
<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 "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 9. März 2006		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 08.05.2006
Name und Postanschrift der Internationalen 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 Bucka, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/013803

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>NAPIER JOHNATHAN A ET AL: "Progress toward the production of long-chain polyunsaturated fatty acids in transgenic plants" LIPIDS, Bd. 39, Nr. 11, November 2004 (2004-11), Seiten 1067-1075, XP008061222 ISSN: 0024-4201 Seite 1069, rechte Spalte - Seite 1070, linke Spalte; Abbildung 1 Seite 1073, rechte Spalte</p> <p>-----</p>	1-10
Y	<p>NAPIER J A ET AL: "The production of long chain polyunsaturated fatty acids in transgenic plants by reverse-engineering" BIOCHIMIE, MASSON, PARIS, FR, Bd. 86, Nr. 11, November 2004 (2004-11), Seiten 785-792, XP004689087 ISSN: 0300-9084 Abbildung 1 Seite 791</p> <p>-----</p>	1-10
A	<p>ABBADI A ET AL: "Transgenic oilseeds as sustainable source of nutritionally relevant C20 and C22 polyunsaturated fatty acids?" EUROPEAN JOURNAL OF LIPID SCIENCE AND TECHNOLOGY, WILEY VCH VERLAG, WEINHEIM, DE, Bd. 103, Nr. 2, Februar 2001 (2001-02), Seiten 106-113, XP002228744 ISSN: 1438-7697 Abbildung 1</p> <p>-----</p>	1-10
A	<p>WO 03/093482 A (BASF PLANT SCIENCE GMBH; CIRPUS, PETRA; RENZ, ANDREAS; LERCHL, JENS; K) 13. November 2003 (2003-11-13) das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-10
A	<p>DREXLER H ET AL: "Metabolic engineering of fatty acids for breeding of new oilseed crops: strategies, problems and first results" JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY, FISCHER, STUTTGART, DE, Bd. 160, Nr. 7, 2003, Seiten 779-802, XP004955255 ISSN: 0176-1617 Seite 794, rechte Spalte - Seite 796, rechte Spalte; Abbildung 6</p> <p>-----</p>	1-10
P,X	<p>WO 2005/012316 A (BASF PLANT SCIENCE GMBH; ZANK, THORSTEN; BAUER, JOERG; CIRPUS, PETRA;) 10. Februar 2005 (2005-02-10) Seite 6 - Seite 15; Anspruch 1</p> <p>-----</p>	1-10
	-/--	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/013803

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	WO 2005/083093 A (BASF PLANT SCIENCE GMBH; CIRPUS, PETRA; BAUER, JOERG; QIU, XIAO; WU, G) 9. September 2005 (2005-09-09) Seite 8 - Seite 16; Anspruch 1 -----	1-10
P,X	WO 2005/083053 A (BASF PLANT SCIENCE GMBH; CIRPUS, PETRA; BAUER, JOERG; ZANK, THORSTEN;) 9. September 2005 (2005-09-09) Ansprüche 1,2 -----	1-10
P,X	ROBERT STAN S ET AL: "Metabolic engineering of Arabidopsis to produce nutritionally important DHA in seed oil" FUNCTIONAL PLANT BIOLOGY, Bd. 32, Nr. 6, 2005, Seiten 473-479, XP008061225 ISSN: 1445-4408 Abbildung 1; Tabelle 1 -----	1-10
P,X	WU GUOHAI ET AL: "Stepwise engineering to produce high yields of very long-chain polyunsaturated fatty acids in plants" NATURE BIOTECHNOLOGY, Bd. 23, Nr. 8, August 2005 (2005-08), Seiten 1013-1017, XP007900180 ISSN: 1087-0156 Abbildung 1; Tabelle 1 -----	1-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PC 1/EP2005/013803

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2004071467 A	26-08-2004	BR PI0406688 A CA 2512589 A1 EP 1592392 A2	04-04-2006 26-08-2004 09-11-2005
WO 03093482 A	13-11-2003	AU 2003232512 A1 CA 2485060 A1 DE 10219203 A1 EP 1501932 A2	17-11-2003 13-11-2003 13-11-2003 02-02-2005
WO 2005012316 A	10-02-2005	CA 2533613 A1	10-02-2005
WO 2005083093 A	09-09-2005	KEINE	
WO 2005083053 A	09-09-2005	KEINE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/013803

Feld Nr. 1 Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz(en) (Fortsetzung von Punkt 1 b) auf Blatt 1)

1. Hinsichtlich der **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz**, die in der internationalen Anmeldung offenbart wurde und für die beanspruchte Erfindung erforderlich ist, ist die internationale Recherche auf folgender Grundlage durchgeführt worden:
 - a. Art des Materials
 - Sequenzprotokoll
 - Tabelle(n) zum Sequenzprotokoll
 - b. Form des Materials
 - in Papierform
 - in elektronischer Form
 - c. Zeitpunkt der Einreichung
 - in der eingereichten internationalen Anmeldung enthalten
 - zusammen mit der internationalen Anmeldung in elektronischer Form eingereicht
 - bei dieser Behörde nachträglich für die Zwecke der Recherche eingereicht
2. Wurden mehr als eine Version oder Kopie eines Sequenzprotokolls und/oder einer dazugehörigen Tabelle eingereicht, so sind zusätzlich die erforderlichen Erklärungen, dass die Information in den nachgereichten oder zusätzlichen Kopien mit der Information in der Anmeldung in der eingereichten Fassung übereinstimmt bzw. nicht über sie hinausgeht, vorgelegt worden.
3. Zusätzliche Bemerkungen:

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefördert.

3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
1-10

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-10

Verfahren zur Herstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in transgenen Organismen mit einem Gehalt von mindestens 1 Gew.-% dieser Verbindungen bezogen auf den Gesamtlipidgehalt des transgenen Organismus, dadurch gekennzeichnet, dass Nukleinsäuren in den Organismus eingebracht werden, welche für die in Anspruch 1 erwähnten Desaturase-Aktivitäten und Elongase-Aktivitäten codieren

2. Ansprüche: 11,12

Lipide oder Fettsäuren oder eine Fraktion davon, die mehrfach ungesättigte Fettsäuren enthalten

3. Anspruch: 13

Verfahren zur Herstellung von Ölen, Lipiden oder Fettsäurezusammensetzungen

4. Anspruch: 14

Verwendung von Ölen, Lipiden oder Fettsäuren in Futter, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika

5. Ansprüche: 15, vollständig; 19-28, teilweise

Isolierte Nukleinsäuren, die für Polypeptide mit delta-6-Desaturaseaktivität codieren, charakterisiert durch die in SEQ ID NO: 13 dargestellte Sequenz, Vektoren und Wirtsorganismen, die diese Sequenz enthalten

6. Ansprüche: 16, vollständig; 19-28, teilweise

Isolierte Nukleinsäuren, die für Polypeptide mit delta-5-Desaturaseaktivität codieren, charakterisiert durch die in SEQ ID NO: 11 dargestellte Sequenz, Vektoren und Wirtsorganismen, die diese Sequenz enthalten

7. Ansprüche: 17, vollständig; 19-28, teilweise

Isolierte Nukleinsäuren, die für Polypeptide mit delta-4-Desaturaseaktivität codieren, charakterisiert durch die in SEQ ID NO: 7 dargestellte Sequenz, Vektoren und Wirtsorganismen, die diese Sequenz enthalten

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

8. Ansprüche: 18, vollständig; 19-28, teilweise

Isolierte Nukleinsäuren, die für Polypeptide mit
delta-12-Desaturaseaktivität codieren, charakterisiert durch
die in SEQ ID NO: 15 dargestellte Sequenz,
Vektoren und Wirtsorganismen, die diese Sequenz enthalten
