



(10) **DE 11 2009 003 708 T5** 2012.09.13

(12)

Veröffentlichung

der internationalen Anmeldung mit der
(87) Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2010/066703**
in deutscher Übersetzung (Art. III § 8 Abs. 2 IntPatÜG)
(21) Deutsches Aktenzeichen: **11 2009 003 708.9**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP2009/066569**
(86) PCT-Anmeldetag: **08.12.2009**
(87) PCT-Veröffentlichungstag: **17.06.2010**
(43) Veröffentlichungstag der PCT Anmeldung
in deutscher Übersetzung: **13.09.2012**

(51) Int Cl.: **C12N 15/82** (2011.01)

C12N 9/02 (2011.01)
C12N 15/53 (2011.01)
C12P 7/64 (2011.01)
A01H 5/00 (2011.01)

(30) Unionspriorität:

08171520.3	12.12.2008	EP
09151937.1	03.02.2009	EP

(74) Vertreter:

Herzog Fiesser & Partner, 68167, Mannheim, DE

(71) Anmelder:

**BASF Plant Science GmbH, 67063, Ludwigshafen,
DE**

(72) Erfinder:

**Senger, Toralf, 69469, Weinheim, DE; Bauer, Jörg,
67117, Limburgerhof, DE; Napier, Jonathan A.,
Hertfordshire, GB**

(54) Bezeichnung: **Desaturasen und Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren in transgenen Organismen**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Polynukleotide aus *Cochliobolus heterostrophus* C5, *Cyanospora* sp. CCY0110, *Mycocentrospora acerina* und *Hyaloperonospora parasitica*, die für Desaturasen kodieren und die für die rekombinante Produktion mehrfach ungesättigter Fettsäuren eingesetzt werden können. Die Erfindung betrifft außerdem Vektoren, Wirtszellen und transgene nicht-menschliche Organismen, die die erfindungsgemäßen Polynukleotide umfassen, und die Polypeptide, die von den Polynukleotiden kodiert werden. Die Erfindung betrifft außerdem Antikörper gegen die erfindungsgemäßen Polypeptide. Schließlich betrifft die Erfindung auch Produktionsverfahren für die mehrfach ungesättigten Fettsäuren und für Öl-, Lipid- und Fettsäurezusammensetzungen und ihre Verwendung als Arzneistoffe, Kosmetika, Nahrungsmittel, Futtermittel, vorzugsweise Fischfutter, oder Nahrungsmittelergänzungen.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Polynukleotide aus *Cochliobolus heterostrophus* C5, *Cyanotheca* sp. CCY0110, *Mycocentrospora acerina* und *Hyaloperonospora parasitica*, die für Desaturasen kodieren und die für die rekombinante Produktion mehrfach ungesättigter Fettsäuren eingesetzt werden können. Die Erfindung betrifft außerdem Vektoren, Wirtszellen und transgene nicht-menschliche Organismen, die die erfindungsgemäßen Polynukleotide umfassen, und die Polypeptide, die von den Polynukleotiden kodiert werden. Die Erfindung betrifft außerdem Antikörper gegen die erfindungsgemäßen Polypeptide. Schließlich betrifft die Erfindung auch Produktionsverfahren für die mehrfach ungesättigten Fettsäuren und für Öl-, Lipid- und Fettsäurezusammensetzungen und ihre Verwendung als Arzneistoffe, Kosmetika, Nahrungsmittel, Futtermittel, vorzugsweise Fischfutter, oder Nahrungsergänzungen.

[0002] Fettsäuren und Triacylglyceride finden eine Vielzahl von Anwendungen in der Nahrungsmittelindustrie, der Tierernährung, der Kosmetik und auf dem pharmakologischen Sektor. Je nachdem, ob es sich um freie gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren oder auch Triacylglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren handelt, eignen sie sich für sehr verschiedene Anwendungen. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren, wie Linolsäure und Linolensäure, sind für Säuger essenziell, weil diese sie nicht selbst herstellen können. Mehrfach ungesättigte ω 3-Fettsäuren und ω 6-Fettsäuren sind deshalb ein wichtiger Bestandteil in der tierischen und menschlichen Ernährung.

[0003] Mehrfach ungesättigte 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 aufgrund ihre verschiedenartigen Rollen bei Gesundheitsaspekten, einschließlich der Entwicklung des kindlichen Gehirns, der Funktionsfähigkeit der Augen, der Synthese von Hormonen und anderen Signalsubstanzen und der Prävention von kardiovaskulären Störungen, von Krebs und Diabetes wichtige Bestandteile der menschlichen Ernährung (Paulos, A *Lipids* 30: 1–14, 1995; Horrocks, LA und Yeo *YK Pharmacol Res* 40: 211–225, 1999). Aus diesem Grund besteht ein Bedarf an der Herstellung mehrfach ungesättigter langkettiger Fettsäuren.

[0004] Aufgrund der heutigen Zusammensetzung der menschlichen Nahrung ist eine Zugabe von mehrfach ungesättigten ω 3-Fettsäuren, die man hauptsächlich in Fischölen findet, zur Nahrung von besonderer Bedeutung. Somit werden zum Beispiel 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) zu Säuglingsformulierungen zugegeben, um den Nährwert zu erhöhen. Von der ungesättigten Fettsäure DHA wird gesagt, dass sie eine positive Wirkung auf die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Hirnfunktionen hat.

[0005] Im Folgenden werden mehrfach ungesättigte Fettsäuren als PUFA, PUFAs, LCPUFA oder LCPUFAs (mehrfach ungesättigte Fettsäuren, engl. poly unsaturated fatty acids, PUFA, langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren, engl. long chain poly unsaturated fatty acids, LCPUFA) bezeichnet.

[0006] Die verschiedenen Fettsäuren und Triglyceride werden hauptsächlich aus Mikroorganismen, wie *Mortierella* und *Schizochytrium*, oder aus ölproduzierenden Pflanzen, wie Sojabohne, Raps, Algen, wie *Cryptocodium* oder *Phaeodactylum*, und anderen Organismen erhalten, wobei sie in der Regel in Form ihrer Triacylglyceride (= Triglyceride = engl. triglycerols) erhalten werden. Sie können jedoch auch aus Tieren, wie zum Beispiel Fisch, erhalten werden. Die freien Fettsäuren werden vorteilhafterweise durch Hydrolyse 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 nicht in Ölpflanzen, wie Raps, Sojabohne, Sonnenblume oder Färberdistel, synthetisiert. Herkömmliche natürliche Quellen für diese Fettsäuren sind Fische, wie Hering, Lachs, Sardine, Rotbarsch, Aal, Karpfen, Forelle, Heilbutt, Makrele, Zander oder Thunfisch, oder Algen.

[0007] Je nach der beabsichtigten Verwendung sind Öle mit gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren bevorzugt. Bei der menschlichen Ernährung sind zum Beispiel Lipide mit ungesättigten Fettsäuren, insbesondere mehrfach ungesättigten Fettsäuren, bevorzugt. Den mehrfach ungesättigten ω 3-Fettsäuren wird nachgesagt, dass sie eine positive Wirkung auf den Cholesterinspiegel im Blut und somit auf die Möglichkeit, Herzkrankheiten vorzubeugen, haben. Das Risiko für eine Herzkrankheit, einen Schlaganfall oder Bluthochdruck kann durch die Zugabe dieser ω 3-Fettsäuren zur Nahrung deutlich verringert werden. ω 3-Fettsäuren haben zudem eine positive Wirkung auf entzündliche, insbesondere chronisch entzündliche, Vorgänge in Verbindung mit Immunkrankheiten, wie rheumatoider Arthritis. Deshalb werden sie zu Nahrungsmitteln, insbesondere zu diätetischen Nahrungsmitteln, hinzugefügt oder in Arzneimitteln eingesetzt. ω 6-Fettsäuren, wie Arachidonsäure,

haben aufgrund unserer normalen Aufnahme mit der Nahrung eine Tendenz zu einer negativen Wirkung auf diese Störungen in Zusammenhang mit diesen rheumatischen Erkrankungen.

[0008] ω 3- und ω 6-Fettsäuren sind Vorläufer von Gewebshormonen, die man als Eicosanoide kennt, wie die Prostaglandine, die von Dihomo- γ -linolensäure, Arachidonsäure und Eicosapentaensäure stammen, und die Thromboxane und Leukotriene, die von Arachidonsäure und Eicosapentaensäure herrühren. Eicosanoide, die aus ω 6-Fettsäuren gebildet werden (als die PG_2 -Reihe bekannt), fördern in der Regel Entzündungsreaktionen, während Eicosanoide aus ω 3-Fettsäuren (als die PG_3 -Reihe bekannt) wenig oder keine proinflammatorische Wirkung besitzen.

[0009] Aufgrund ihrer positiven Eigenschaften gab es in der Vergangenheit keinen Mangel an Versuchen, Gene, die an der Synthese von Fettsäuren oder Triglyceriden beteiligt sind, für die Herstellung von Ölen mit einem modifizierten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren in verschiedenen Organismen verfügbar zu machen. So beschreiben die WO 91/13972 und ihr US-Äquivalent eine Δ 9-Desaturase. WO 93/11245 beansprucht eine Δ 15-Desaturase und WO 94/11516 eine Δ 12-Desaturase. Weitere Desaturasen werden zum Beispiel 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, Wade et al., Nature 347, 1990: 200–203 oder Huang et al., Lipids 34, 1999: 649–659 beschrieben. Die biochemische Charakterisierung der verschiedenen Desaturasen ist jedoch bis heute unzureichend, weil die Enzyme, die membrangebundene Proteine sind, bei ihrer Isolation und Charakterisierung große Schwierigkeiten bereiten (McKeon et al., Methods in Enzymol. 71, 1981: 12141–12147, Wang et al., Plant Physiol. Biochem., 26, 1988: 777–792). In der Regel werden membrangebundene Desaturasen charakterisiert, indem sie in einen geeigneten Organismus eingebracht werden, der anschließend hinsichtlich seiner Enzymaktivität analysiert wird, indem man die Ausgangsmaterialien und die Produkte analysiert. Δ 6-Desaturasen sind in WO 93/06712, US 5,614,393, WO 96/21022, WO 00/21557 und WO 99/27111 beschrieben. ihre Anwendung für die Produktion in transgenen Organismen ist zum Beispiel in WO 98/46763, WO 98/46764 und WO 98/46765 beschrieben. In diesem Zusammenhang ist auch die Expression verschiedener Desaturasen und die Bildung mehrfach ungesättigter Fettsäuren beschrieben und beansprucht; siehe zum Beispiel WO 99/64616 oder WO 98/46776. Hinsichtlich der Effizienz der Expression von Desaturasen und ihrer Wirkung auf die Bildung mehrfach ungesättigter Fettsäuren muss darauf hingewiesen werden, dass die bis heute beschriebene Expression einer einzigen Desaturase nur zu niedrigen Gehalten an ungesättigten Fettsäuren/Lipiden, wie zum Beispiel γ -Linalensäure und Stearidonsäure, geführt hat. Außerdem wurde in der Regel ein Gemisch von ω 3- und ω 6-Fettsäuren erhalten.

[0010] Besonders geeignete Mikroorganismen für die Produktion von PUFAs sind Mikroalgen, wie *Phaeodactylum tricornutum*, *Porphiridium*-Spezies, *Thraustochytrium*-Spezies, *Schizochytrium*-Spezies oder *Cryptocodium*-Spezies, Ciliaten, wie *Stylonychia* oder *Colpidium*, Pilze, wie *Mortierella*, *Entomophthora* oder *Mucor*, und/oder Moose, wie *Physcomitrella*, vorzugsweise *Physcomitrella patens*, *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). Stammselektion führte zur Entwicklung einer Reihe von Mutantenstämmen der in Frage kommenden Mikroorganismen, die eine Reihe wünschenswerter Verbindungen, einschließlich PUFAs, produzieren. Die Mutation und Selektion von Stämmen mit einer verbesserten Produktion eines bestimmten Moleküls, wie der mehrfach ungesättigten Fettsäuren, ist jedoch ein zeitraubendes und schwieriges Verfahren. Aus diesem Grund sind Rekombinationsverfahren, wie vorstehend beschrieben, wann immer möglich bevorzugt. Mithilfe der vorstehend erwähnten Mikroorganismen können jedoch nur beschränkte Mengen der gewünschten mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wie DPA, EPA oder ARA, produziert werden. Je nach dem verwendeten Mikroorganismus werden diese außerdem gewöhnlich als Fettsäuregemische von zum Beispiel EPA, DPA und ARA hergestellt.

[0011] Eine Vielzahl von Synthesewegen wird für die Synthese von Arachidonsäure, Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) diskutiert. So werden EPA oder DHA in Meeresbakterien, wie *Vibrio* sp. oder *Shewanella* sp., über den Polyketid-Weg produziert (Yu, R. et al. *Lipids* 35: 1061–1064, 2000; Takeyama, H. et al. *Microbiology* 143: 2725–2731, 1997).

[0012] Eine alternative Strategie ist die abwechselnde 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 in Zank et al. und in Sakuradani et al. beschriebenen Wegs über Δ 6-Desaturase, Δ 6-Elongase, Δ 5-Desaturase, Δ 5-Elongase und Δ 4-Desaturase ist der Sprecher-Syntheseweg (Sprecher 2000, *Biochim. Biophys. Acta* 1486: 219–231) bei Säugern. Anstelle der Δ 4-Desaturierung wird hier ein weiterer Elongationsschritt durchgeführt, wobei C_{24} erhalten wird, gefolgt von einer weiteren Δ 6-Desaturierung und schließlich β -Oxidation, so dass die

Kettenlänge C₂₂ erhalten wird. Dieser so genannte Sprecher-Syntheseweg ist jedoch nicht für die Produktion in Pflanzen und Mikroorganismen geeignet, weil die Regulationsmechanismen noch nicht bekannt sind.

[0013] Je nach ihrem Desaturierungsmuster lassen sich die mehrfach ungesättigten Fettsäuren in zwei große Klassen unterteilen, nämlich die ω 6- bzw. die ω 3-Fettsäuren, die sich hinsichtlich ihrer metabolischen und funktionellen Aktivitäten unterscheiden. Das Ausgangsmaterial für den ω 6-Stoffwechselweg ist die Fettsäure Linolsäure (18:2 ^{Δ 9,12}), wohingegen der ω 3-Weg über Linolensäure (18:3 ^{Δ 9,12,15}) abläuft. Linolensäure wird durch die Aktivität einer Δ 15-Desaturase gebildet (Tocher et al. 1998, Prog. Lipid Res. 37, 73–117; Domergue et al. 2002, Eur. J. Biochem. 269, 4105–4113).

[0014] Säuger und somit auch Menschen besitzen keine entsprechende Desaturase-Aktivität (Δ 12- und Δ 15-Desaturase) und müssen diese Fettsäuren (essenzielle Fettsäuren) über die Nahrung aufnehmen. Ausgehend von diesen Vorstufen werden die physiologisch wichtigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren Arachidonsäure (= ARA, 20:4 ^{Δ 5,8,11,14}), eine ω 6-Fettsäure, und die beiden ω 3-Fettsäuren Eicosapentaensäure (= EPA, 20:5 ^{Δ 5,8,11,14,17}) und Docosahexaensäure (DHA, 22:6 ^{Δ 4,7,10,13,17,19}) über die Abfolge von Desaturase- und Elongase-Reaktionen synthetisiert. Die Applikation von ω 3-Fettsäuren zeigt die vorstehend beschriebene therapeutische Aktivität bei der Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen (Shimikawa 2001, World Rev. Nutr. Diet. 88, 100–108), Entzündungen (Calder 2002, Proc. Nutr. Soc. 61, 345–358) und Arthritis (Cleland und James 2000, J. Rheumatol. 27, 2305–2307).

[0015] Höhere Pflanzen umfassen mehrfach ungesättigte Fettsäuren, wie Linolsäure (18:2) und Linolensäure (18:3). ARA, EPA und DHA findet man überhaupt nicht oder nur in winzigen Mengen im Samenöl höherer Pflanzen (E. Ucciani: Nouveau Dictionnaire des Huiles Végétales [Neues Wörterbuch der Pflanzenöle]. Technique & Documentation Lavoisier, 1995. ISBN: 2-7430-0009-0). Die Herstellung von LCPUFAs in höheren Pflanzen (vorzugsweise in Ölpflanzen, wie Raps, Lein, Sonnenblume und Sojabohnen) wäre jedoch vorteilhaft, weil große Mengen an qualitativ hochwertigen LCPUFAs für die Nahrungsmittelindustrie, die Tierernährung und für pharmazeutische Zwecke ökonomisch erhalten werden könnten. Ein möglicher Weg verläuft über Rekombinationsverfahren, wobei man Gene, die für Enzyme der LCPUFA-Biosynthese kodieren, in Ölpflanzen einbringt und exprimiert. Diese Gene kodieren zum Beispiel für Δ 6-Desaturasen, Δ 6-Elongasen, Δ 5-Desaturasen oder Δ 4-Desaturasen. Diese Gene können vorteilhafterweise aus Mikroorganismen und niederen Pflanzen isoliert werden, die LCPUFAs produzieren und sie in die Membranen oder in Triacylglyceride einbauen. So ist es bereits gelungen, Δ 6-Desaturase-Gene aus dem Moos Physcomitrella patens und Δ 6-Elongase-Gene aus P. patens und dem Nematoden C. elegans zu isolieren (Zank, T. K. et al. Plant Journal 31: 255–268, 2002, Beaudoin et al. Biochem Soc Trans 28: 661–663, 2000).

[0016] Die ersten transgenen Pflanzen, die Gene umfassen und exprimieren, die LCPUFA-Biosynthese-Enzyme kodieren, und die LCPUFAs produzieren, hat man zum Beispiel in der DE-A-102 19 203 (Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren in Pflanzen) beschrieben. Diese Pflanzen produzieren jedoch LCPUFAs in Mengen, die eine weitere Optimierung für die Verarbeitung der Öle, die in den Pflanzen vorhanden sind, erforderlich machen.

[0017] Es besteht daher ein großer Bedarf an Mitteln und Maßnahmen für ein einfaches, kostengünstiges Verfahren zur Herstellung dieser mehrfach ungesättigten Fettsäuren, speziell in eukaryotischen Systemen, um die Anreicherung von Nahrung und Futter mit diesen mehrfach ungesättigten Fettsäuren sicherzustellen.

[0018] Die Aufgabe, auf der die vorliegende Erfindung basiert, ist die Bereitstellung solcher Mittel und Maßnahmen. Die Aufgabe wird durch die Ausführungsformen gelöst, die in den Patentansprüchen und hier nachstehend beschrieben sind.

[0019] Die vorliegende Erfindung betrifft somit ein Polynukleotid, das eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus:

- (a) Nukleinsäuresequenz, wie in einer der SEQ ID Nr. 1, 2, 8, 9, 15, 16, 50 oder 51 dargestellt;
- (b) Nukleinsäuresequenz, die ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz umfasst, wie in einer der SEQ ID Nr. 3, 10, 17 oder 52 dargestellt;
- (c) Nukleinsäuresequenz die mindestens 70% Identität mit einer der Nukleinsäuresequenzen unter (a) oder (b) aufweist und die ein Polypeptid mit einer Desaturase-Aktivität kodiert; und
- (d) Nukleinsäuresequenz für ein Fragment einer Nukleinsäure unter (a), (b) oder (c), wobei das Fragment für ein Polypeptid mit einer Desaturase-Aktivität kodiert.

[0020] Die Klasse der ω 6-Fettsäuren basiert auf der ω 6-Fettsäure Linolsäure (18:2 Δ 9,12), wohingegen die Klasse der ω 3-Fettsäuren auf der (3-Fettsäure Linolensäure (18:3(9,12,15) basiert; siehe **Fig. 1**. These beiden Fettsäuren sind die Substrate für die Synthese langkettiger (6- beziehungsweise (3-PUFAs. Die Zunahme des Gehalts dieser Fettsäuren in Abhängigkeit von den Genen, die eingebracht werden, führt zu einer Zunahme des Gehalts an langkettigen PUFAs.

[0021] Die vorliegende Erfindung stellt Polynukleotidsequenzen bereit, die zu einer Zunahme der Substrate 18:2(9,12 beziehungsweise 18:3(9,12,15 führen. Man hat Polynukleotidsequenzen identifiziert, die für Enzyme mit (12-Desaturase-Aktivität, mit (12- und (15-Desaturase-Aktivität, mit (15-Desaturase-Aktivität oder mit (3-Desaturase-Aktivität kodieren.

[0022] Erfindungsgemäß bezieht sich "Polynukleotid" auf Polynukleotide, die Nukleinsäuresequenzen umfassen, die für Polypeptide mit Desaturase-Aktivität kodieren. Die Desaturase-Aktivitäten werden vorzugsweise für die Biosynthese von Lipiden oder Fettsäuren benötigt. Besonders bevorzugt nehmen sie die Form der folgenden Desaturase-Aktivitäten an: Δ 12-Desaturase-, Δ 15-Desaturase-, Δ 12- und Δ 15-Desaturase- oder Omega-3-Desaturase-Aktivität. Die Desaturasen sind vorzugsweise an der Synthese mehrfach ungesättigter Fettsäuren (PUFAs) und besonders bevorzugt an der Synthese langkettiger PUFAs (LCPUFAs) beteiligt. Geeignete Nachweissysteme für diese Desaturase-Aktivitäten sind in den Beispielen oder in WO 2005/083053 beschrieben. Die erfindungsgemäßen Desaturase-Aktivitäten besitzen besonders bevorzugt Substratspezifitäten und/oder Umwandlungsraten, die vergleichbar mit denjenigen der jeweiligen homologen Desaturase-Enzyme aus *Pythium irregulare*, *Ostreococcus tauri*, *Phytophthora sojae* oder *Phytophthora infestans* sind. Die spezifischen erfindungsgemäßen Polynukleotide, d. h. die Polynukleotide mit einer Nukleinsäuresequenz, wie in SEQ ID Nr.: 1, 2, 8, 9, 15, 16, 50 oder 51 gezeigt, sind aus *Cochliobolus heterostrophus* C5, *Cyanothece* sp. CCY 0110, *Polaromonas* sp. JS666, *Prochlorococcus marinus* Stamm MIT 9313, *Synechococcus* sp. PCC 7335, *Mycocentrospora acerina* oder *Hyaloperonospora parasitica* erhalten worden.

[0023] Genauer gesagt, stammen die Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID Nr. 1 und 2 aus *Cochliobolus heterostrophus* C5, die Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID Nr. 8 und 9 aus *Cyanothece* sp. CCY0110, die Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID Nr. 15 und 16 aus *Mycocentrospora acerina* und die Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID Nr. 50 und 51 aus *Hyaloperonospora parasitica*. Bei den SEQ ID Nr. 1, 8 und 50 handelt es sich um genomische Sequenzen, SEQ ID Nr. 15 ist ein mRNA-Transkript, wohingegen die SEQ ID Nr. 2, 9, 16 und 51 kodierende Sequenzen (cds) sind. Die SEQ ID Nr. 3, 10, 17 und 52 zeigen die entsprechenden Aminosäuresequenzen.

[0024] Somit sind erfindungsgemäße Polynukleotide besonders bevorzugt: Polynukleotide, die für ein Polypeptid mit Δ 15-Desaturase-Aktivität kodieren und die Folgendes umfassen: (i) eine Nukleinsäuresequenz, wie in SEQ ID Nr. 1 oder 2 gezeigt, (ii) eine Nukleinsäuresequenz, die ein Polypeptid, wie in SEQ ID Nr. 3 gezeigt, kodiert, (iii) eine Nukleinsäuresequenz, die mindestens 70% Identität mit einer der Nukleinsäuresequenzen unter (i) oder (ii) aufweist, oder (iv) eine Nukleinsäuresequenz für ein Fragment einer Nukleinsäure unter (i), (ii) oder (iii), wobei das Fragment ein Polypeptid mit einer Δ 15-Desaturase-Aktivität kodiert.

[0025] Polynukleotide, die ein Polypeptid mit Δ 15-Desaturase-Aktivität kodieren und die Folgendes umfassen: (i) eine Nukleinsäuresequenz, wie in SEQ ID Nr. 8 oder 9 gezeigt, (ii) eine Nukleinsäuresequenz, die ein Polypeptid, wie in SEQ ID Nr. 10 gezeigt, kodiert, (iii) eine Nukleinsäuresequenz, die mindestens 70% Identität mit einer der Nukleinsäuresequenzen unter (i) oder (ii) aufweist, oder (iv) eine Nukleinsäuresequenz für ein Fragment einer Nukleinsäure unter (i), (ii) oder (iii), wobei das Fragment für ein Polypeptid mit einer Δ 15-Desaturase-Aktivität kodiert.

[0026] Polynukleotide, die für ein Polypeptid mit Δ 12-Desaturase-Aktivität kodieren und die Folgendes umfassen: (i) eine Nukleinsäuresequenz, wie in SEQ ID Nr. 15 oder 16 gezeigt, (ii) eine Nukleinsäuresequenz, die ein Polypeptid, wie in SEQ ID Nr. 17 gezeigt, kodiert, (iii) eine Nukleinsäuresequenz, die mindestens 70% Identität mit einer der Nukleinsäuresequenzen unter (i) oder (ii) aufweist, oder (iv) eine Nukleinsäuresequenz für ein Fragment einer Nukleinsäure unter (i), (ii) oder (iii), wobei das Fragment für ein Polypeptid mit einer Δ 12-Desaturase-Aktivität kodiert.

[0027] Polynukleotide, die für ein Polypeptid mit ω 3-Desaturase-Aktivität kodieren und die Folgendes umfassen: (i) eine Nukleinsäuresequenz, wie in SEQ ID Nr. 50 oder 51 gezeigt, (ii) eine Nukleinsäuresequenz, die ein Polypeptid, wie in SEQ ID Nr. 52 gezeigt, kodiert, (iii) eine Nukleinsäuresequenz, die mindestens 70% Identität mit einer der Nukleinsäuresequenzen unter (i) oder (ii) aufweist, oder (iv) eine Nukleinsäuresequenz

für ein Fragment einer Nukleinsäure unter (I), (ii) oder (iii), wobei das Fragment für ein Polypeptid mit einer ω 3-Desaturase-Aktivität kodiert.

[0028] Der Begriff "delta-12-Desaturase (oder Δ -12-Desaturase oder d-12-Desaturase oder d12-Des oder d12 Des)" oder "delta-12-Desaturase-(oder Δ -12-Desaturase- oder d-12-Desaturase- oder d12-Des- oder d12Des-)Aktivität", wie er im vorliegenden Kontext verwendet wird, betrifft ein Enzym mit der Enzymfunktion zur Dehydrierung von C18-Fettsäuren, die bereits am C-Atom 9-10 dehydriert sind. Hier sind die C-Atome C12 und C13 in jedem Fall um ein Wasserstoffatom dehydriert, wodurch eine Doppelbindung zwischen diesen beiden C-Atomen erhalten wird.

[0029] Der Begriff "delta-15-Desaturase (oder Δ -15-Desaturase oder d-15-Desaturase oder d15-Des oder d15 Des)" oder "delta-15-Desaturase-(oder Δ -15-Desaturase- oder d-15-Desaturase- oder d15-Des- oder d15Des-)Aktivität", wie er im vorliegenden Kontext verwendet wird, betrifft ein Enzym mit der Enzymfunktion zur Dehydrierung von C18- und/oder C20-Fettsäuren, die an den C-Atomen 6-7, 8-9, 9-10, 12-13 und/oder 13-14 dehydriert sind. Hier sind die C-Atome C15-16 und/oder C17-18 in jedem Fall um ein Wasserstoffatom dehydriert, wodurch eine Doppelbindung zwischen den beiden C-Atomen erhalten wird.

[0030] Der Begriff "delta-12- und delta-15-Desaturase (oder Δ -12- und Δ -15-Desaturase oder wie hier vorstehend geschrieben)" oder "delta-12- und delta-15-Desaturase-(oder Δ -12- und Δ -15-Desaturase- oder wie hier vorstehend geschrieben)Aktivität", wie er im vorliegenden Kontext verwendet wird, betrifft ein Enzym mit der Enzymfunktion zur Dehydrierung von C18- und/oder C20-Fettsäuren, die an den C-Atomen 6-7, 8-9, 9-10 und/oder 13-14 dehydriert sind. Hier sind die C-Atome C12-13 und C15-16 und/oder C17-18 in jedem Fall um ein Wasserstoffatom dehydriert, wodurch eine Doppelbindung zwischen den beiden C-Atomen erhalten wird.

[0031] Der Begriff "omega-3-Desaturase (oder (3-Desaturase oder (3-Des oder (3Des oder omega3-Des oder o3Des)" oder "omega-3-Desaturase- (oder (3-Desaturase- oder (3-Des- oder (3Des- oder omega3-Des- oder o3Des-)Aktivität", wie er im vorliegenden Kontext verwendet wird, betrifft ein Enzym mit der Enzymfunktion zur Dehydrierung von C18-, C20- und/oder C22-Fettsäuren, die an den C-Atomen 4-5, 5-6, 6-7, 8-9, 9-10, 13-14 und/oder 16-17 dehydriert sind. Hier sind die C-Atome C15-16 und/oder C17-18 und/oder C19-20 in jedem Fall um ein Wasserstoffatom dehydriert, wodurch eine Doppelbindung zwischen den beiden C-Atomen erhalten wird.

[0032] Erfindungsgemäße Desaturasen umfassen besonders bevorzugt aufeinander folgend das Desaturase-Motiv 1 "GX10HX3HX13GX9PX3WX3H" (SEQ ID Nr. 46), das Desaturase-Motiv 2 "PX14(H/Q)H" (SEQ ID Nr. 47) und entweder das Desaturase-Motiv 3 "HX2HHX5PXY" (SEQ ID Nr. 48) oder das Desaturase-Motiv 4 "HX2HHX6PXY" (SEQ ID Nr. 49), wobei X für eine beliebige Aminosäure steht. Ob es sich um eine Δ 12-, Δ 15- oder omega3-Desaturase handelt, kann aus der Aminosäure an der variablen Position 16 des Desaturase-Motivs 2 (H oder Q) abgeleitet werden: Q = Glutamin ist ein Hinweis auf putative Δ 12-Desaturasen, H = Histidin ist ein Hinweis auf Δ 15- oder omega3-Desaturasen.

[0033] In diesem Zusammenhang sei gesagt, dass die erfindungsgemäßen Polynukleotidsequenzen oder Peptidsequenzen vorzugsweise aus den vorstehend genannten Organismen stammen.

[0034] Es ist deutlich, dass angesichts der Degeneration des genetischen Codes die vorstehend genannten spezifischen Sequenzen auch modifiziert werden können, wobei die modifizierten Polynukleotide immer noch für Polypeptide mit einer Aminosäuresequenz, wie in einer der SEQ ID Nr. 3, 10, 17 oder 52 dargestellt, kodieren und die vorstehend genannten Desaturase-Aktivitäten besitzen.

[0035] Der Begriff "Polynukleotid" umfasst auch Varianten der vorstehenden spezifischen Polynukleotide. Diese können die Form von homologen, orthologen oder paralogen Sequenzen annehmen. Solche Varianten umfassen vorzugsweise Nukleinsäuresequenzen, die mindestens eine Rasensubstitution, eine Rasenaddition oder eine Basendeletion umfassen, wobei beabsichtigt ist, dass die Varianten immer noch für ein Polypeptid mit der vorstehend genannten biologischen Aktivität der entsprechenden Ausgangssequenz kodieren. Varianten umfassen Polynukleotide, die zur Hybridisierung mit den vorstehend erwähnten Polynukleotiden, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen, in der Lage sind. Besonders bevorzugte stringente 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 Beispiel für stringente Hybridisierungsbedingungen sind Hybridisierungen in 6 X Natriumchlorid/Natriumcitrat (= SSC) bei etwa 45°C, vorzugsweise 50°C, 55°C, 60°C und am stärksten bevorzugt bei 62°C, gefolgt von einem oder mehreren Waschschritten in 0,1 X SSC, 0,1% SDS bei 50 bis 65°C, vorzugsweise 55 bis 65°C, sogar noch stärker bevorzugt bei 60 bis 65°C. Der Fachmann

weiß, dass diese Hybridisierungsbedingungen sich je nach dem Typ der Nukleinsäure und, wenn zum Beispiel organische Lösungsmittel vorliegen, im Hinblick auf die Temperatur und die Pufferkonzentration unterscheiden. Unter "Standard-Hybridisierungsbedingungen" variiert die Temperatur 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). Wenn organisches Lösungsmittel in dem vorstehend genannten Puffer vorliegt, zum Beispiel 50% Formamid, beträgt die Temperatur unter Standardbedingungen etwa 42°C. Die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride sind vorzugsweise 0,1 K SSC und 20°C bis 45°C, vorzugsweise zwischen 30°C und 45°C. Die Hybridisierungsbedingungen für DNA:RNA Hybride sind zum Beispiel vorzugsweise 0,1 X SSC und 30°C bis 55°C, vorzugsweise zwischen 45°C und 55°C. Die vorstehend genannten Hybridisierungstemperaturen werden zum Beispiel 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 man die erforderlichen Hybridisierungsbedingungen mithilfe von Lehrbüchern, wie dem vorstehend genannten, oder aus den folgenden Lehrbüchern bestimmt: Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; Hames und Higgins (Hrsg.) 1985, "Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (Hrsg.) 1991, "Essential Molecular Biology: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford. Alternativ können Varianten der erfindungsgemäßen spezifischen Polynukleotide auch durch Verfahren auf der Basis der Polymerasekettenreaktion (PCR) bereitgestellt werden. Zu diesem Zweck lassen sich zunächst Primer aus konservierten Sequenzen (zum Beispiel Sequenzen, die für funktionelle Domänen in dem Polypeptid kodieren) ableiten. Konservierte Sequenzen können durch Sequenzvergleiche mit Polynukleotiden, die für Polypeptide mit einer ähnlichen Aktivität kodieren, bestimmt werden. Die verwendete Matrize kann DNA oder cDNA aus Bakterien, Pilzen, Pflanzen oder Tieren sein. Mittels PCR erhaltene DNA-Fragmente können für die Durchmusterung von geeigneten genomischen Banken oder cDNA-Banken verwendet werden, um – wenn erforderlich – den vollständigen offenen Leserahmen des Polynukleotids zu isolieren und diesen mittels Sequenzieren zu bestimmen. Bevorzugte Varianten umfassen Polynukleotide, die eine Nukleinsäuresequenz aufweisen, die mindestens 50%, mindestens 55%, mindestens 60%, mindestens 65%, mindestens 70%, mindestens 75%, mindestens 80%, mindestens 81%, mindestens 82%, mindestens 83%, mindestens 84%, mindestens 85%, mindestens 86%, mindestens 87%, mindestens 88%, mindestens 89%, mindestens 90%, mindestens 91%, mindestens 92%, mindestens 93%, mindestens 94%, mindestens 95%, mindestens 96%, mindestens 97%, mindestens 98% oder mindestens 99% (oder eine andere Prozentangabe als hier erwähnt) Identität zu einer der vorstehend genannten spezifischen Nukleotidsequenzen hat und die für ein Polypeptid mit der entsprechenden biologischen Aktivität kodiert. Ebenfalls bevorzugt umfasst sind Polynukleotide, die Nukleinsäuresequenzen umfassen, die für ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz mit mindestens 50%, mindestens 55%, mindestens 60%, mindestens 65%, mindestens 70%, mindestens 75%, mindestens 80%, mindestens 81%, mindestens 82%, mindestens 83%, mindestens 84%, mindestens 85%, mindestens 86%, mindestens 87%, mindestens 88%, mindestens 89%, mindestens 90%, mindestens 91%, mindestens 92%, mindestens 93%, mindestens 94%, mindestens 95%, mindestens 96%, mindestens 97%, mindestens 98% oder mindestens 99% (oder eine andere Prozentangabe als hier erwähnt) Identität zu einer der vorstehend genannten spezifischen Aminosäuresequenzen kodieren, wobei das Polypeptid die entsprechende biologische Aktivität der Ausgangssequenz beibehält.

[0036] Prozent identischer Nukleotide oder Aminosäuren betrifft vorzugsweise einen Sequenzabschnitt von mindestens 50% der Sequenzen, die verglichen werden sollen, und besonders bevorzugt über die gesamte Länge der Sequenzen, die verglichen werden sollen. Eine Vielzahl von Programmen, die Algorithmen für solche Vergleiche verwenden, ist im Stand der Technik beschrieben und im Handel erhältlich. Insbesondere kann auf die Algorithmen von Needleman und Wunsch oder Smith und Waterman verwiesen werden, die besonders zuverlässige Ergebnisse liefern. Diese Algorithmen können vorzugsweise mit folgenden Programmen implementiert werden: PileUp (J. Mol. Evolution., 25, 351–360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151–153), Gap und BestFit (Needleman und Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443–453 (1970)) und Smith und Waterman (Adv. Appl. Math. 2; 482–489 (1981))) als Teil des GCG-Softwarepakets (Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711, 1991). Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung ist es besonders bevorzugt, wenn die Prozent (%) Sequenzidentität mit dem GAP-Programm über die gesamte Sequenz mit den folgenden Parametern bestimmt werden: Lückengewichtung: 50, Längengewichtung: 3, durchschnittlicher Match: 10.000 und durchschnittlicher Mismatch: 0.000.

[0037] Ein Polynukleotid, das nur ein Fragment der vorstehend genannten Nukleotidsequenzen umfasst, ist ebenfalls ein erfindungsgemäßes Polynukleotid. Hier ist beabsichtigt, dass das Fragment für ein Polypeptid kodiert, das die biologische Aktivität der Ausgangssequenz oder des Polypeptids, für das die letztere kodiert, umfasst. Polypeptide, die von solchen Polynukleotiden kodiert werden, umfassen daher Domänen der vorstehend genannten spezifischen Polypeptide (Ausgangspolypeptide), die die biologische Aktivität verleihen, oder bestehen daraus. Für die Zwecke der Erfindung umfasst ein Fragment vorzugsweise mindestens 50, mindes-

tens 100, mindestens 250 oder mindestens 500 aufeinander folgende Nukleotide der vorstehend erwähnten spezifischen Sequenzen oder kodiert für eine Aminosäuresequenz, die mindestens 20, mindestens 30, mindestens 50, mindestens 80, mindestens 100 oder mindestens 150 aufeinander folgende Aminosäuren von einer der vorstehend erwähnten spezifischen Aminosäuresequenzen umfasst, und verleiht die biologische Aktivität, vorzugsweise die Desaturase-Aktivität, wie hier vorstehend beschrieben.

[0038] Die erfindungsgemäßen Polynukleotidvarianten umfassen vorzugsweise mindestens 10%, mindestens 20%, mindestens 30%, mindestens 40%, mindestens 50%, mindestens 60%, mindestens 70%, mindestens 80% oder mindestens 90% der entsprechenden biologischen Aktivität des Polypeptids, das von der Ausgangssequenz kodiert wird. D. h., die Polypeptide, die von den erfindungsgemäßen Polynukleotiden kodiert werden, können am Stoffwechsel von Verbindungen teilnehmen, die für die Synthese von Fettsäuren, Fettsäureestern, wie Diacylglyceriden und/oder Triacylglyceriden, in einem Organismus, vorzugsweise in einer Pflanze oder Pflanzenzelle, benötigt werden, oder können am Transport von Molekülen über Membranen, d. h. von C₁₈-, C₂₀- oder C₂₂-Kohlenstoffketten im Fettsäuremolekül mit Doppelbindungen an mindestens zwei, vorteilhafterweise drei, vier, fünf oder sechs Positionen, teilnehmen.

[0039] Die erfindungsgemäßen Polynukleotide umfassen entweder die vorstehend erwähnten spezifischen Nukleinsäuresequenzen oder bestehen daraus. D. h., dass die erfindungsgemäßen Polynukleotide im Prinzip auch weitere Nukleotide enthalten können. Dabei kann es sich vorzugsweise um untranslatierte 3'- oder 5'-Regionen der genomischen Nukleotidsequenz handeln. Sie bestehen vorzugsweise aus mindestens 100, 200 oder 500 Nukleotiden am 5'-Terminus und aus mindestens 20, 50 oder 100 Nukleotiden am 3'-Terminus der kodierenden Region. Weiterhin sind Polynukleotide, die zusätzliche Nukleinsäuresequenzen umfassen, diejenigen, die für Fusionsproteine kodieren. Solche Fusionsproteine können für weitere Polypeptide oder Polypeptidabschnitte zusätzlich zu den vorstehend genannten Polypeptiden kodieren. Das zusätzliche Polypeptid oder der zusätzliche Polypeptidabschnitt kann die Form weiterer Enzyme der Lipid- oder Fettsäure-Biosynthese annehmen. Andere, die verwendbar sind, sind Polypeptide, die als Expressionsmarker dienen können (grün, gelb, rot, blau fluoreszierende Proteine, alkalische Phosphatase und andere), oder so genannte "Tags" als Marker oder als Hilfsmittel für die Reinigung (zum Beispiel FLAG-Tags, 6-Histidin-Tags, MYC-Tags und andere).

[0040] Polynukleotidvarianten können aus verschiedenen natürlichen oder künstlichen Quellen isoliert werden. Zum Beispiel können sie künstlich durch in vitro- und in vivo-Mutagenese hergestellt werden. Homologe oder Orthologe der spezifischen Sequenzen können aus einem breiten Spektrum an Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen erhalten werden. Vorzugsweise werden sie aus Algen erhalten. Algen, wie Isochrysis, Euglena oder Cryptocodinium, Algen/Diatomeen, wie Thalassiosira, Phaeodactylum oder Thraustochytrium, Pythium, Moose, wie Physcomitrella, vorzugsweise Physcomitrella patens, oder Geratodon sind bevorzugt, ganz besonders bevorzugt sind die Algen die Gattung Euglena oder die Diatomeen der Klasse Oomycota, wie die Gattungen Pythium oder Phytophthora, oder Pilze, wie Postia placenta oder Microdochium nivale, oder aus der Abteilung Zygomycota aus den Gattungen Rhizopus, Aspergillus, Thraustochytrium, Phytophthora, Entomophthora, Mucor oder Mortierella. Die Polynukleotide können auch aus Pflanzen, vorzugsweise aus der Familie Selaginellaceae, wie Selaginella moellendorffii, oder aus höheren Pflanzen, wie Primulaceae, wie Aleuritia, Calendula stellata, Osteospermum spinescens oder Osteospermum hyoseroides, Bakterien, wie Shewanella, Cyanobakterien, wie Synechococcus, Hefen oder Fieren, wie Nematoden, zum Beispiel Caenorhabditis, Mollusken, Insekten oder Fisch erhalten werden. Die Polynukleotidvarianten stammen vorzugsweise auch aus einem Tier aus der Ordnung der Vertebraten. Besonders bevorzugt stammen die Polynukleotide aus der Klasse Vertebrata; Euteleostomi, Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei, Protacanthopterygii, Salmoniformes; Salmonidae oder Oncorhynchus und ganz besonders bevorzugt aus der Ordnung Salmoniformes, wie der Familie Salmonidae, wie die Gattung Salmo, zum Beispiel aus den Gattungen und Spezies Oncorhynchus mykiss, Trutta trutta oder Salmo trutta fario. Hier können die erfindungsgemäßen Polynukleotide mittels molekularbiologischer Standardtechniken und der hier bereitgestellten Sequenzinformation isoliert werden. Es ist auch möglich, mithilfe von vergleichenden Algorithmen zum Beispiel eine homologe Sequenz oder homologe konservierte Sequenzregionen auf DNA- oder Aminosäure-Ebene zu identifizieren. Diese können als Hybridisierungssonde eingesetzt werden und Standard-Hybridisierungstechniken (wie zum Beispiel die in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. Ausg., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, beschriebenen) können zur Isolation weiterer Nukleinsäuresequenzen, die für das Verfahren geeignet sind, eingesetzt werden. Es ist außerdem möglich, Polynukleotide oder Fragmente davon mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) zu isolieren, wobei Oligonukleotidprimer eingesetzt werden, die auf dieser Sequenz oder Teilen davon basieren (zum Beispiel kann ein Nukleinsäuremolekül, das die vollständige Sequenz oder einen Teil davon umfasst, mittels Polymerasekettenreaktion unter Verwendung von Oligonukleotidprimern isoliert werden, die auf der Basis dieser selben Sequenz hergestellt worden sind). Zum Beispiel ist es möglich, mRNA aus Zellen zu isolieren (zum Beispiel mithilfe des Guani-

diniumthiocyanat-Extraktionsverfahrens von Chirgwin et al. (1979) *Biochemistry* 18: 5294–5299) und cDNA kann mithilfe von reverser Transkriptase (zum Beispiel Moloney MLV reverser Transkriptase, die von Gibco/BRL, Bethesda, MD, erhältlich ist, oder AMV reverser Transkriptase, die von Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL, erhältlich ist) hergestellt werden. Synthetische Oligonukleotidprimer für die Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion können auf der Basis der in den SEQ ID Nummern (SEQ ID Nr.) gezeigten Polynukleotid- und Aminosäuresequenzen hergestellt werden. Eine erfindungsgemäße Nukleinsäure kann unter Verwendung von cDNA oder alternativ genomischer DNA als Matrize und geeigneten Oligonukleotidprimern gemäß Standard-PCR-Amplifikationstechniken amplifiziert werden. Die amplifizierte Nukleinsäure kann somit in einen geeigneten Vektor kloniert und mittels DNA-Sequenzanalyse charakterisiert werden. Oligonukleotide, die einer Desaturase-Nukleotidsequenz entsprechen, können mittels Standard-Syntheseverfahren, zum Beispiel unter Verwendung einer automatischen DNA-Syntheseapparatur, hergestellt werden.

[0041] Die erfindungsgemäßen Polynukleotide können entweder in Form isolierter Polynukleotide (d. h. aus ihrem natürlichen Ursprung, zum Beispiel dem genomischen Locus, isoliert) oder auch in genetisch modifizierter Form bereitgestellt werden (d. h. die Polynukleotide können auch an ihrem natürlichen Genlocus vorliegen, müssen aber in diesem Fall genetisch modifiziert sein). Ein isoliertes Polynukleotid umfasst vorzugsweise weniger als 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb oder 0,1 kb der Nukleinsäuresequenz, die natürlicherweise in seiner Umgebung vorkommt. Das erfindungsgemäße Polynukleotid kann als einzelsträngiges oder doppelsträngiges Nukleinsäuremolekül vorliegen und die Form von genomischer DNA, cDNA oder RNA annehmen. Vorzugsweise besteht das erfindungsgemäße Polynukleotid aus RNA oder DNA. Die erfindungsgemäßen Polynukleotide umfassen alle Orientierungen der in den SEQ ID-Nummern gezeigt Sequenzen, d. h. auch komplementäre Stränge und reverse, oder revers-komplementäre Orientierungen. Der Begriff umfasst außerdem auch chemisch modifizierte Nukleinsäuren, wie die natürlich vorkommenden methylierten DNA-Moleküle, oder künstliche Nukleinsäuren, zum Beispiel biotinylierte Nukleinsäuren.

[0042] Die Erfindung umfasst auch Oligonukleotide von mindestens 15 bp, vorzugsweise mindestens 20 bp, mindestens 25 bp, mindestens 30 bp, mindestens 35 bp oder mindestens 50 bp, die in der Lage sind, spezifisch unter stringenten Bedingungen mit einem der vorstehend genannten Polynukleotide zu hybridisieren. Die Oligonukleotide können aus DNA oder RNA oder beidem bestehen. Solche Oligonukleotide können als Primer für die PCR, als die Expression hemmende Antisense-Oligonukleotide, für RNA-Interferenz-(RNAi-)Ansätze oder für chimäroplastische oder genoplastische Ansätze eingesetzt werden. RNAi-Verfahren sind zum Beispiel beschrieben in Fire et al., *Nature* (1998) 391: 806–811; Fire, *Trends Genet.* 15, 358–363 (1999); Sharp, *RNA interference* 2001. *Genes Dev.* 15, 485–490 (2001); Hammond et al. *Nature Rev. Genet.* 2, 1110–1119 (2001); Tuschl, *Chem. Biochem.* 2, 239–245 (2001); Hamilton et al., *Science* 286, 950–952 (1999); Hammond et al., *Nature* 404, 293–296 (2000); Zamore et al., *Cell* 101, 25–33 (2000); Bernstein et al., *Nature* 409, 363–366 (2001); Elbashir et al., *Genes Dev.* 15, 188–200 (2001); WO 01/29058; WO 99/32619; oder Elbashir et al., 2001 *Nature* 411: 494–498 und dienen zur Hemmung der Genexpression durch Abbau der mRNA. Chimäroplastische oder genoplastische Ansätze dienen der in vivo-Modifikation (zum Beispiel dem Einbringen von Punktmutationen) in Gene an ihren endogenen Loci. Entsprechende Verfahren sind in US5,565,350, US5,756,325, US5,871,984, US5,731,181, US5,795,972, US6,573,046, US6,211,351, US6,586,184, US6,271,360 und US6,479,292 offenbart.

[0043] Es hat sich herausgestellt, dass die erfindungsgemäßen Polynukleotide vorteilhafterweise besonders effizient für die rekombinante Produktion mehrfach ungesättigter Fettsäuren in Wirtszellen und in transgenen Organismen eingesetzt werden können. Genauer gesagt, sind die Polypeptide, die von den erfindungsgemäßen Polynukleotiden kodiert werden und die $\Delta 12$ -Desaturase, $\Delta 15$ -Desaturase, $\Delta 12$ - und $\Delta 15$ -Desaturase oder omega-3-Desaturase-Aktivität besitzen, in der Lage, C_{18} -, C_{20} - und C_{22} -Fettsäuren mit einer, zwei, drei, vier oder fünf Doppelbindungen und vorzugsweise mehrfach ungesättigte C_{18} -Fettsäuren mit einer, zwei oder drei Doppelbindungen, wie C18:1(9), C18:2(9,12) oder C18:3(6,9,12), mehrfach ungesättigte C_{20} -Fettsäuren mit drei oder vier Doppelbindungen, wie C20:3(8,11,14), C20:4(5,8,11,14) oder C20:4(8,11,14,17), oder mehrfach ungesättigte C_{22} -Fettsäuren mit vier oder fünf Doppelbindungen, wie C22:4(7,10,13,16) oder C22:5(7,10,13,16,19), umzuwandeln. Besonders bevorzugt führen die erfindungsgemäßen Polynukleotid- und Aminosäuresequenzen zu einer Zunahme der 18:2(9,12- oder 18:3(9,12,15)-Fettsäuren. **Fig. 1** zeigt, wo diese erfindungsgemäßen Desaturasen in die Biosynthese von langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren eingreifen und/oder wie sie für die Produktion dieser Fettsäuren verwendet werden können.

[0044] In diesem Zusammenhang ist es besonders bevorzugt, wenn man die $\Delta 6$ -Desaturase, die von der Polynukleotidsequenz mit der SEQ ID Nr. 22 kodiert wird, (d6Des(Pir)), die $\Delta 6$ -Elongase, die von der Polynukleotidsequenz mit der SEQ ID Nr. 31 kodiert wird, (d6Elo(Pp)), die $\Delta 5$ -Desaturase, die von der Polynukleotidsequenz mit der SEQ ID Nr. 25 kodiert wird, (d5Des(Tc)), die $\Delta 15$ -Elongase, die von der Polynukleotidsequenz

mit der SEQ ID Nr. 34 kodiert wird, (d5Des(Ot)), die $\Delta 14$ -Desaturase, die von der Polynukleotidsequenz mit der SEQ ID Nr. 37 kodiert wird, (d4Des(Tc)), die $\Delta 6$ -Elongase, die von der Polynukleotidsequenz mit der SEQ ID Nr. 40 kodiert wird, (d6Elo(Tp)), die $\Delta 6$ -Desaturase, die von der Polynukleotidsequenz mit der SEQ ID Nr. 41 kodiert wird, (doDes(Tc)), mit einer oder mehreren der erfindungsgemäßen Desaturasen zur Synthese langkettiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren einsetzt; siehe in diesem Zusammenhang WO2006/100241. Alternativ war es auch möglich, eine $\Delta 9$ -Elongase und eine $\Delta 8$ -Desaturase anstelle der vorstehend genannten $\Delta 6$ -Desaturase und der $\Delta 6$ -Elongase einzusetzen, wie in WO2004/057001 beschrieben. Je nach der Fettsäure, die hergestellt werden soll, ist es möglich, in den hier nachstehend beschriebenen Wirtszellen oder transgenen Organismen ein Vielzahl von Kombinationen der erfindungsgemäßen Polynukleotide mit den vorstehend genannten Desaturasen oder Elongasen zu coexprimieren oder bei den erfindungsgemäßen Verfahren zu verwenden. Besonders bevorzugte Kombinationen zur Herstellung von Eicosapentaensäure sind hier nachstehend in den Tabellen 5 und 8 und für Docosahexaensäure in Tabelle 6 gezeigt. Zum Beispiel ist es möglich, eine erfindungsgemäße $\Delta 12$ -Desaturase, $\Delta 15$ -Desaturase, $\Delta 12$ - und $\Delta 15$ -Desaturase oder Omega-3-Desaturase allein oder in einer geeigneten Kombination (zum Beispiel eine $\Delta 12$ -Desaturase und eine $\Delta 15$ -Desaturase) zusammen mit d6Des(Pir) und/oder d6Des(Ot), d6Elo(Pp), d5Des(Tc) und $\omega 3$ Des(Pi) zur Herstellung von EPA zu verwenden. Ebenso kann eine erfindungsgemäße $\Delta 12$ -Desaturase, $\Delta 15$ -Desaturase, $\Delta 12$ - und $\Delta 15$ -Desaturase oder Omega-3-Desaturase allein oder in einer geeigneten Kombination zusammen mit d6Des(Pir) und/oder d6Des(Ot), d6Elo(Pp), d5Des(Tc), $\omega 3$ Des(Pi), d5Elo(Ot), d4Des(Tc) zur Herstellung von Docosahexaensäure verwendet werden.

[0045] Vorzugsweise sind die Fettsäuren in Phospholipiden oder CoA-Fettsäureestern, vorteilhafterweise in den CoA-Fettsäureestern, desaturiert. Somit ist eine einfache, kostengünstige Produktion dieser mehrfach ungesättigten Fettsäuren, speziell in eukaryotischen Systemen, möglich. Die mithilfe der erfindungsgemäßen Polynukleotide hergestellten ungesättigten Fettsäuren können dann als Öl-, Lipid- und Fettsäurezusammensetzungen formuliert und auf geeignete Weise eingesetzt werden.

[0046] Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem einen Vektor, der das erfindungsgemäße Polynukleotid umfasst.

[0047] Der Begriff "Vektor" betrifft ein Nukleinsäuremolekül, das in der Lage ist, ein anderes Nukleinsäuremolekül, wie die erfindungsgemäßen Polynukleotide, an die es gebunden ist, zu transportieren. Ein Typ des Vektors ist ein Plasmid, eine zirkuläre doppelsträngige DNA-Schleife, in die zusätzliche DNA-Abschnitte ligiert werden können. Ein weiterer Typ des Vektors ist ein viraler Vektor, wobei es möglich ist, dass zusätzliche DNA-Abschnitte in das virale Genom ligiert werden. Bestimmte Vektoren (zum Beispiel bakterielle Vektoren mit bakteriellem Replikationsursprung) sind zur autonomen Replikation in einer Wirtszelle, in die sie eingebracht worden sind, in der Lage. Andere Vektoren werden vorteilhafterweise in das Genom einer Wirtszelle integriert, wenn sie in die Wirtszelle eingebracht werden, und replizieren somit zusammen mit dem Wirtsgenom. Außerdem können bestimmte Vektoren die Expression von Genen, mit denen sie sich in funktionsfähiger Verknüpfung befinden, steuern. Diese Vektoren werden im vorliegenden Kontext 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, weil das Plasmid die am häufigsten verwendete Form des Vektors ist. Die Erfindung soll jedoch auch andere Formen von Expressionsvektoren umfassen, wie virale Vektoren, die ähnliche Funktionen aufweisen. Außerdem soll der Begriff "Vektor" auch andere Vektoren umfassen, mit denen der Fachmann vertraut ist, wie Phagen, Viren, wie SV40, CMV, TMV, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Phagemide, Cosmide, lineare oder zirkuläre DNA, künstliche Chromosomen. Schließlich umfasst der Begriff auch Konstrukte für die zielgesteuerte, d. h. homologe, Rekombination oder die heterologe Insertion von Polynukleotiden.

[0048] Vektoren können in prokaryotische und eukaryotische Zellen durch herkömmliche Transformations- oder Transfektionstechniken eingebracht werden. Die Begriffe "Transformation" und "Transfektion", Konjugation und Transduktion, wie sie im vorliegenden Zusammenhang verwendet werden, sollen eine Reihe von Verfahren des Standes der Technik zum Einbringen von fremder Nukleinsäure (zum Beispiel DNA) in eine Wirtszelle umfassen, einschließlich Calciumphosphat-, Rubidiumchlorid- oder Calciumchlorid-Coprazipitation, DEAE-Dextran-vermittelter Transfektion, Lipofektion, natürlicher Kompetenz, chemisch vermitteltem Transfer, Elektroporation oder Partikelbeschuss. Geeignete Verfahren für die Transformation oder Transfektion von Wirtszellen, einschließlich Pflanzenzellen, lassen sich in Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Ausg., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) und anderen Laborhandbüchern, wie Methods in Molecular Biology, 1995, Bd. 44, Agrobacterium protocols, Hrsg.: Gartland und Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey, finden.

[0049] Geeignete Klonierungsvektoren sind dem Fachmann allgemein bekannt. Insbesondere gehören dazu Vektoren, die in mikrobiellen Systemen replizierbar sind, d. h. größtenteils solche Vektoren, die eine effiziente Klonierung in Hefen oder Pilzen gewährleisten und die stabile Transformation von Pflanzen ermöglichen. Diejenigen, die erwähnt werden müssen, sind insbesondere verschiedene binäre und co-integrierte Vektorsysteme, die für die T-DNA-vermittelte Transformation geeignet sind. Solche Vektorsysteme sind in der Regel dadurch charakterisiert, dass sie mindestens die *vir*-Gene enthalten, die für die Agrobacterium-vermittelte Transformation benötigt werden, und die Sequenzen, die die T-DNA begrenzen (T-DNA-Grenze). Diese Vektorsysteme umfassen vorzugsweise weiterhin auch cis-regulatorische Regionen, wie Promotoren und Terminatoren, und/oder Selektionsmarker, mit denen geeignet transformierte Organismen identifiziert werden können. Während im Fall der co-integrierten Vektorsysteme die *vir*-Gene und die T-DNA Sequenzen auf demselben Vektor angeordnet sind, basieren binäre Systeme auf mindestens zwei Vektoren, von denen einer die *vir*-Gene, aber keine T-DNA trägt, wohingegen ein zweiter die T-DNA, aber kein *vir*-Gen trägt. Infolgedessen sind die letztgenannten Vektoren relativ klein, leicht zu manipulieren und können sowohl in *E. coli* als auch in Agrobacterium replizieren. Diese binären Vektoren sind u. a. Vektoren aus der pBIB-HYG-Reihe, der pPZP-Reihe, der pBecks-Reihe und der pGreen-Reihe. Erfindungsgemäß werden vorzugsweise Bin19, pBI101, pBinAR, pGPTV und pCAMBIA verwendet. Ein Überblick über binäre Vektoren und ihre Verwendung lässt sich in Hellens et al, Trends in Plant Science (2000) 5, 446–451 finden. Die Vektoren mit den inserierten erfindungsgemäßen Polynukleotiden können stabil unter Selektionsbedingungen in Mikroorganismen, insbesondere in *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens*, vermehrt werden und ermöglichen einen Transfer von heterologer DNA in Pflanzen oder Mikroorganismen. Die erfindungsgemäßen Polynukleotide können mithilfe der Klonierungsvektoren in Organismen, wie Mikroorganismen oder Pflanzen, eingebracht und somit zum Transformieren von Pflanzen verwendet werden. Für diesen Zweck geeignete Vektoren sind veröffentlicht in: 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, Hrsg.: 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, Hrsg.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128–143; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205–225.

[0050] Der Vektor ist vorzugsweise ein Expressionsvektor. Das Polynukleotid liegt in dem erfindungsgemäßen Expressionsvektor in funktionsfähiger (d. h. funktioneller) Verknüpfung mit einer Expressionskontrollsequenz vor. Die Expressionskontrollsequenz wird zusammen mit dem Polynukleotid und gegebenenfalls weiteren Sequenzelementen des Vektors auch als Expressionskassette bezeichnet. Die Expressionskontrollsequenz gewährleistet, dass das Polynukleotid nach der Transformation oder Transfektion in eine Wirtszelle exprimiert werden kann. Die zu verwendende Expressionskontrollsequenz umfasst vorzugsweise cis-regulatorische Elemente, wie Promotor- und/oder Enhancer-Nukleinsäuresequenzen, die mithilfe der Transkriptionsmaschinerie der Wirtszellen erkannt werden. Der Begriff umfasst außerdem weitere Expressionskontrollelemente, zum Beispiel Polyadenylierungssignale und RNA-stabilisierende Sequenzen. Diese regulatorischen Sequenzen sind zum Beispiel beschrieben in Goettel: 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, Hrsg.: Glick und Thompson, Kapitel 7, 89–108, einschließlich der darin genannten Literatur. Expressionskontrollsequenzen umfassen solche, die die konstitutive Expression einer Nukleotidsequenz in vielen Typen von Wirtszellen steuern, und solche, die die direkte Expression der Nukleotidsequenz nur in bestimmten Wirtszellen unter bestimmten Bedingungen steuern. Der Fachmann weiß, dass das Design des Expressionsvektors von Faktoren, wie der Auswahl der Wirtszelle, die transformiert werden soll, dem Ausmaß der Expression des gewünschten Proteins und dergleichen abhängen kann. Die erfindungsgemäßen Polynukleotide können in einer oder mehreren Kopien in der Expressionskassette oder in dem erfindungsgemäßen Expressionsvektor (zum Beispiel in Form mehrerer Expressionskassetten) vorliegen. Hier können die regulatorischen Sequenzen oder Faktoren vorzugsweise eine positive Wirkung auf die Genexpression der eingebrachten Gene, wie vorstehend beschrieben, besitzen und diese dadurch steigern. Somit ist es möglich, die regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Ebene der Transkription unter Verwendung starker Transkriptionssignale, wie Promotoren und/oder "Enhancer", zu verstärken. Daneben ist es auch möglich, die Translation zu verstärken, zum Beispiel durch Verbesserung der mRNA-Stabilität. Weitere Expressionskontrollsequenzen innerhalb der erfindungsgemäßen Bedeutung sind Translationsterminatoren am 3'-Ende der Polynukleotide, die translatiert werden sollen. Ein Beispiel, das hier verwendet werden kann, ist der OCS1-Terminator. Wie im Fall der Promotoren sollte für jedes Polynukleotid, das exprimiert werden soll, eine andere Terminatorsequenz verwendet werden.

[0051] Bevorzugte Expressionskontrollsequenzen oder regulatorische Sequenzen liegen in Promotoren vor, wie den *cos*-, *tac*-, *trp*-, *tet*-, *trp-tet*-, *lpp*-, *lac*-, *lpp-lac*-, *lacIq*-, T7-, T5-, T3-, *gal*-, *trc*-, *ara*-, SP6-, λ -PR- oder λ -PL-Promotoren, und werden vorteilhafterweise in Gram-negativen Bakterien eingesetzt. Weitere vorteilhafte

regulatorische Sequenzen liegen zum Beispiel in den Gram-positiven Promotoren amy und SPO2, in den Hefe- oder Pilz-Promotoren ADC1, MF α , AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEE, rp28, ADH oder in den Pflanzen-Promotoren 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 sind auch induzierbare Promotoren vorteilhaft, wie die Promotoren, die in EP-A-0 388 186 (Benzolsulfonamid-induzierbar), Plant J. 2, 1992: 397–404 (Gatz et al., Tetracyclin-induzierbar), EP-A-0 335 528 (Abszissinsäure-induzierbar) oder WO 93/21334 (Ethanol- oder Cyclohexenol-induzierbar) beschrieben sind. Weitere geeignete Pflanzen-Promotoren sind der cytosolische FBPase-Promotor oder der ST-LSI-Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8, 1989, 2445), der Glycine max-Phosphoribosylpyrophosphatamidotransferase-Promotor (Genbank Zugangs-Nr. U87999) oder der in EP-A-0 249 676 beschriebene nodienspezifische Promotor. Besonders vorteilhafte Promotoren sind Promotoren, die die Expression in Geweben ermöglichen, die an der Biosynthese von Fettsäuren beteiligt sind. Ganz besonders vorteilhaft sind samenspezifische Promotoren, wie der USP-Promotor, aber auch andere Promotoren, wie der LeB4-, DC3-, Phaseolin- oder Napin-Promotor. Weitere besonders vorteilhafte Promotoren sind samenspezifische Promotoren, die für einkeimblättrige oder zweikeimblättrige Pflanzen verwendet werden können und die in US 5,608,152 (Raps-Napin-Promotor), WO 98/45461 (Arabidopsis-Oleosin-Promotor), US 5,504,200 (Phaseolus vulgaris-Phaseolin-Promotor), WO 91/13980 (Brassica-Bce4-Promotor), von Baumlein et al., Plant J., 2, 2, 1992: 233–239 (LeB4-Promotor aus einer Leguminose) beschrieben sind, wobei diese Promotoren für Dikotyledonen geeignet sind. Beispiele für Promotoren, die für Monokotyledonen geeignet sind, sind der lpt-2- oder lpt-1-Promotor aus Gerste (WO 95/15389 und WO 95/23230), der Hordein-Promotor aus Gerste und andere geeignete Promotoren, die in WO 99/16890 beschrieben sind. Im Prinzip ist es möglich, alle natürlichen Promotoren zusammen mit ihren regulatorischen Sequenzen, wie den vorstehend genannten, als Expressionskontrollsequenzen zu verwenden. Es ist auch möglich, synthetische Promotoren, entweder zusätzlich oder allein, zu verwenden, insbesondere wenn sie die samenspezifische Expression vermitteln, wie zum Beispiel in WO 99/16890 beschrieben.

[0052] Damit ein besonders hoher PUFA-Gehalt, insbesondere in transgenen Pflanzen, erzielt wird, sollten die erfindungsgemäßen Polynukleotide vorzugsweise in Ölpflanzen auf samenspezifische Weise exprimiert werden. Zu diesem Zweck können samenspezifische Promotoren oder Promotoren, die im Embryo und/oder im Endosperm aktiv sind, verwendet werden. Im Prinzip können samenspezifische Promotoren sowohl aus zweikeimblättrigen als auch aus einkeimblättrigen Pflanzen isoliert werden. Vorteilhafte bevorzugte Promotoren sind hier nachstehend aufgeführt: USP (= unbekanntes Samenprotein) und Vicilin (Vicia faba) [Baumlein et al., Mol. Gen. Genet., 1991, 225(3)], Napin (Raps) [US 5,608,152], Acylcarrierprotein (Raps) [US 5,315,001 und WO 92/18634], Oleosin (Arabidopsis thaliana) [WO 98/45461 und WO 93120216], Phaseolin (Phaseolus vulgaris) [US 5,504,200], Bce4 [WO 91/13980], Leguminosen-B4 (LegB4-Promoter) [Baumlein et al., Plant J., 2, 2, 1992], Lpt2 und lpt1 (Gerste) [WO 95/15389 und WO 95/23230], samenspezifische Promotoren aus Reis, Mais und Weizen WO 99/16890], Amy32b, Amy 6-6 und Aleurain [US 5,677,474], Bce4 (Raps) [US 5,530,149], Glycinin (Sojabohne) [EP 571 741], Phosphoenolpyruvatcarboxylase (Sojabohne) [JP 06/62870], ADR12-2 (Sojabohne) [WO 98/08962], Isocitratlyase (Raps) [US 5,689,040] oder α -Amylase (Gerste) [EP 781 849].

[0053] Die Pflanzengenexpression kann auch über einen chemisch induzierbaren Promoter erleichtert werden (eine Übersicht siehe in Gatz 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48: 89–108). Chemisch induzierbare Promotoren sind besonders dann geeignet, wenn gewünscht ist, dass die Genexpression auf zeitspezifische Weise stattfinden soll. Beispiele für solche Promotoren sind ein Salicylsäure-induzierbarer Promoter (WO 95/19443), ein Tetracyclin-induzierbarer Promoter (Gatz et al. (1992) Plant J. 2, 397–404) und ein Ethanol-induzierbarer Promoter.

[0054] Um eine stabile Integration der verschiedenen Biosynthesegene in die transgene Pflanze über ein Vielzahl von Generationen zu gewährleisten, sollte jedes der erfindungsgemäßen Polynukleotide unter der Kontrolle eines separaten Promoters exprimiert werden, vorzugsweise eines Promoters, der sich von den anderen Promotoren unterscheidet, weil sich wiederholende Sequenzmotive zu Instabilität der T-DNA oder zu Rekombinationsereignissen führen können. In diesem Zusammenhang wird die Expressionskassette vorteilhafterweise derart konstruiert, dass auf einen Promotor eine geeignete Spaltstelle (vorteilhafterweise in einem Polylinker) für die Insertion der Nukleinsäure, die exprimiert werden soll, folgt, und, wenn anwendbar, wird dann ein Terminator hinter dem Polylinker platziert. Diese Sequenz wird mehrere Male, vorzugsweise drei, vier oder fünf Male, wiederholt, so dass bis zu fünf Gene in einem Konstrukt kombiniert und in die transgene Pflanze eingebracht werden können, damit sie exprimiert werden. Vorteilhafterweise wird die Sequenz bis zu drei Mal wiederholt. Um die Nukleinsäuresequenzen zu exprimieren, werden die letzteren hinter dem Promotor über eine geeignete Spaltstelle, zum Beispiel im Polylinker, inseriert. Vorteilhafterweise weist jede Nukleinsäuresequenz ihren eigenen Promotor und, wenn anwendbar, ihren eigenen Terminator auf. Solche vorteilhaften Konstrukte sind zum Beispiel in DE 101 02 337 oder DE 101 02 338 offenbart. Es ist jedoch auch möglich, ein Vielzahl

von Nukleinsäuresequenzen hinter einem Promotor und, wenn anwendbar, vor einem Terminator zu inserieren. Hier ist die Insertionsstelle oder die Sequenz der inserierten Nukleinsäuren in der Expressionskassette nicht von entscheidender Bedeutung, d. h., dass eine Nukleinsäuresequenz an der ersten oder der letzten Position in der Kassette inseriert werden kann, ohne dass ihre Expression dadurch erheblich beeinflusst wird. Vorteilhafterweise können verschiedene Promotoren, wie zum Beispiel der USP-, der LegB4- oder der DC3-Promotor, und verschiedene Terminatoren in der Expressionskassette verwendet werden. Es ist jedoch auch möglich, nur einen Typ des Promotors in der Kassette zu verwenden. Dies kann jedoch zu ungewünschten Rekombinationsereignissen führen.

[0055] Die verwendeten rekombinanten Expressionsvektoren können für die Expression in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen gestaltet werden. Dies ist vorteilhaft, weil Zwischenschritte der Vektorkonstruktion der Einfachheit halber oft in Mikroorganismen durchgeführt werden. Zum Beispiel können die $\Delta 12$ -Desaturase-, $\Delta 15$ -Desaturase-, $\Delta 12$ - und $\Delta 15$ -Desaturase-, $\omega 3$ -Desaturase-, $\Delta 6$ -Desaturase-, $\Delta 6$ -Elongase-, $\Delta 9$ -Elongase-, $\Delta 8$ -Desaturase-, $\Delta 5$ -Desaturase-, $\Delta 5$ -Elongase- und/oder $\Delta 4$ -Desaturase-Gene in bakteriellen Zellen, Insektenzellen (unter Verwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren), Hefe- und anderen Pilzzellen (siehe Romanas, M. A., et al. (1992) "Foreign gene expression in yeast: a review", *Yeast* 8: 423–488; van den Handel, C.A.M.J.J., et al. (1991) "Heterologous gene expression in filamentous fungi", in: *More Gene Manipulations in Fungi*, J. W. Rennet & L. L. Lasure, Hrsg., 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., Hrsg., S. 1–28, Cambridge University Press: Cambridge), Algen (Falciatore et al., 1999, *Marine Biotechnology* 1, 3: 239–251), Ciliaten der folgenden Typen: Holotrichia, Peritrichia, Spirotrichia, Suctoria, Tetrahymena, Paramecium, Colpidium, Glaucoma, Platyophrya, Potomacus, Desaturapseudocohnilembus, Euplotes, Engelmaniella und Stylonychia, insbesondere die Gattung Stylonychia lemnae, unter Verwendung von Vektoren bei einem Transformationsverfahren, wie in WO 98/01572 beschrieben, und vorzugsweise in Zellen vielzelliger Pflanzen (siehe Schmidt, R. und Willmitzer, L. (1988) "High efficiency Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation von 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. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, in: *Transgenic Plants*, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsg.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128–43; Potrykus, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991), 205–225 (und die darin genannten Literaturstellen)) exprimiert werden. Geeignete Wirtszellen sind außerdem in Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) erläutert. Als Alternative kann der rekombinante Expressionsvektor in vitro transkribiert und translatiert werden, zum Beispiel unter Verwendung von regulatorischen Sequenzen des T7-Promotors und von T7-Polymerase.

[0056] In den meisten Fällen beinhaltet die Expression von Proteinen in Prokaryoten die Verwendung von Vektoren, die konstitutive oder induzierbare Promotoren umfassen, die die Expression von Fusions- oder Nicht-Fusionsproteinen steuern. Typische Fusionsexpressionsvektoren 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), in denen Glutathion-S-transferase (GST), Maltose-E-bindendes Protein bzw. Protein A mit dem rekombinanten Zielprotein fusioniert sind. 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 Zielgen-Expression von dem Vektor pTrc basiert auf der Transkription von einem Hybrid-trp-lac-Fusionspromotor durch die RNA-Polymerase des Wirts. Die Zielgen-Expression von dem Vektor pET 11d basiert auf der Transkription von einem T7-gn10-lac-Fusionspromotor, die durch eine virale RNA-Polymerase (T7 gn1) vermittelt wird, die co-exprimiert wird. Diese virale Polymerase wird von den Wirtsstämmen BL21 (DE3) oder HMS174 (DE3) aus einem residenten λ -Prophagen bereitgestellt, der ein T7 gn1-Gen unter der Transkriptionskontrolle des lacUV5-Promotors enthält. Dem Fachmann sind andere Vektoren bekannt, die für prokaryotische Organismen geeignet sind; bei diesen Vektoren handelt es sich zum Beispiel in E. coli um pLG338 pAOYC184, 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 oder pBdCl, in Streptomyces um pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361, in Bacillus um pUB110, pC194 oder pBD214, in Corynebacterium um pSA77 oder pAJ667.

[0057] In einer weiteren Ausführungsform ist der Expressionsvektor ein Hefe-Expressionsvektor. Beispiele für Vektoren für die 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) und pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren und Verfahren für die Konstruktion von Vektoren, die für die Verwendung in anderen Pilzen, wie filamentösen Pilzen, geeignet sind, umfassen

solche, die im einzelnen in: von 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., Hrsg., S. 1–28, Cambridge University Press: Cambridge, oder in: More Gene Manipulations in Fungi (J. W. Gennett & L. L. Lasure, Hrsg., S. 396–428: Academic Press: San Diego) beschrieben werden. Weitere geeignete Hefevektoren sind zum Beispiel pAG-1, YEp6, YEp13 oder pEMBLye23.

[0058] Als Alternative können die erfindungsgemäßen Polynukleotide auch in Insektenzellen unter Verwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren exprimiert werden. Baculovirus-Vektoren, die für die Expression von Proteinen in gezüchteten Insektenzellen (zum Beispiel 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).

[0059] Bevorzugte Pflanzen-Expressionsvektoren umfassen solche, die im einzelnen 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, Hrsg.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15–38. Eine Pflanzenexpressionskassette umfasst vorzugsweise regulatorische Sequenzen, die in der Lage sind, die Expression von Genen in Pflanzenzellen zu steuern, und die funktionsfähig verknüpft werden, so dass jede Sequenz, zum Beispiel Polyadenylierungssignale, ihre Funktion, wie Transkriptionstermination, erfüllen kann. Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind solche, die von Agrobacterium tumefaciens-T-DNA stammen, wie das Gen 3 des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835 ff.), das als Octopinsynthase bekannt ist, oder funktionelle Äquivalente davon, aber alle anderen Terminatoren, die in Pflanzen funktionell aktiv sind, sind ebenfalls geeignet. Weil die Pflanzengenexpression sehr oft nicht auf die Transkriptionsspiegel beschränkt ist, umfasst eine Pflanzenexpressionskassette vorzugsweise andere funktionsfähig verknüpfte Sequenzen, wie Translationsenhancer, zum Beispiel die Overdrive-Sequenz, die die 5'-untranslatierte Leadersequenz des Tabak-Mosaikvirus umfasst, die das Protein/RNA-Verhältnis erhöht (Gallie et al., 1987, Nucl. Acids Research 15: 8693–8711). Wie vorstehend beschrieben, muss die Pflanzengenexpression funktionsfähig mit einem geeigneten Promoter verknüpft sein, der die Genexpression mit der korrekten zeitlichen Steuerung oder auf zell- oder gewebespezifische Weise auslöst. Verwendbare Promotoren sind konstitutive Promotoren (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989) 2195–2202), wie solche, 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 Promoter der kleinen Untereinheit der Rubisco, der in US 4,962,028 beschrieben ist. Andere bevorzugte Sequenzen, die in Pflanzengenexpressionskassetten funktionell verknüpft werden können, sind Zielsteuerungssequenzen, die für die Zielsteuerung des Genprodukts in sein entsprechendes Zellkompartiment erforderlich sind (eine Übersicht siehe in Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996) 285–423 und die darin genannten Literaturstellen), zum Beispiel in die Vakuole, den Zellkern, alle Arten von Plastiden, wie Amyloplasten, Chloroplasten, Chromoplasten, den Extrazellularraum, die Mitochondrien, das endoplasmatische Retikulum, Ölkörper, Peroxisomen und andere Kompartimente von Pflanzenzellen.

[0060] Wie vorstehend beschrieben, kann die Pflanzengenexpression auch über einen chemisch induzierbaren Promotor erleichtert werden (eine Übersicht siehe in Gatz 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48: 89–108). Chemisch induzierbare Promotoren sind besonders dann geeignet, wenn gewünscht ist, 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. Promotoren, die auf biotische oder abiotische Stressbedingungen reagieren, sind ebenfalls geeignet, zum Beispiel der Pathogen-induzierte 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 wundeninduzierbare pinII-Promotor (EP A 0 375 091).

[0061] Besonders bevorzugt sind solche Promotoren, die die Genexpression in Geweben und Organen, in denen die Biosynthese von Fettsäuren, Lipiden und Ölen erfolgt, in Samenzellen, wie den Zellen des Endosperms und des sich entwickelnden Embryos, bewirken. Geeignete Promotoren sind der Napin-Gen-Promotor aus Raps (US 5,608,152), der USP-Promotor aus Vicia faba (Baeumlein et al., Mol. Gen. Genet., 1991, 225 (3): 459–67), der Oleosin-Promotor aus Arabidopsis (WO 98145461), der Phaseolin-Promotor aus Phaseolus vulgaris (US 5,504,200), der Bce4-Promotor aus Brassica (WO 91/13980) oder der Leguminosen-B4-Promotor (LeB4; Baeumlein et al., 1992, Plant Journal, 2 (2): 233–9) und Promotoren, die die samenspezifische Expression in monokotylen Pflanzen, wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis und dergleichen, bewirken. Geeignete erwähnenswerte Promotoren sind der Ipt2- oder Ipt1-Genpromotor aus Gerste (WO 95/15389 und

WO 95/23230) oder die Promotoren aus den Hordein-Gen der Gerste, dem Glutelin-Gen von Reis, dem Oryzin-Gen von Reis, dem Prolamin-Gen von Reis, dem Gliadin-Gen aus Weizen, dem Glutelin-Gen aus Weizen, dem Zein-Gen aus Mais, dem Glutelin-Gen aus Hafer, dem Kasirin-Gen aus Sorghum oder dem Secalin-Gen aus Roggen, die in WO 99/16890 beschrieben sind. Besonders geeignete Promotoren sind auch diejenigen, die die plastidenspezifische Expression bewirken, weil Plastiden das Kompartiment sind, in dem die Vorläufer und einige Endprodukte der Lipidbiosynthese synthetisiert werden. Geeignete Promotoren, wie der virale RNA-Polymerase-Promotor, werden in WO 95/16783 und WO 97/06250 beschrieben, und der in WO 99/46394 beschriebene clpP-Promotor aus Arabidopsis.

[0062] Die vorstehend genannten Vektoren geben nur einen kleinen Überblick über Vektoren, die geeignet sind. Weitere Plasmide sind dem Fachmann bekannt und werden zum Beispiel beschrieben in: Cloning Vectors (Hrsg. 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. Ausg., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

[0063] Wie vorstehend beschrieben, kann der Expressionsvektor zusätzlich zu den erfindungsgemäßen Polynukleotiden auch weitere Gene umfassen, die in die Organismen eingebracht werden sollen. Es ist möglich und bevorzugt, in die Wirtsorganismen regulatorische Gene, wie Gene für Induktoren, Repressoren oder Enzyme, die infolge ihrer enzymatischen Aktivität in die Regulation eines oder mehrerer Gene eines Biosynthesewegs eingreifen, einzubringen und in ihnen exprimieren. Diese Gene können heterologen oder homologen Ursprungs sein. Heterologe Gene oder Polynukleotide stammen aus einem Organismus eines anderen Ursprungs als der Zielorganismus, in den die Gene oder Polynukleotide eingebracht werden sollen. Im Fall homologer Gene oder Polynukleotide sind Zielorganismus und Ursprungsorganismus identisch. Der Vektor umfasst deshalb vorzugsweise mindestens ein weiteres Polynukleotid, das für ein weiteres Enzym kodiert, das an der Biosynthese von Lipiden oder Fettsäuren beteiligt ist. Das Enzym wird vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus: Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP [= Acylcarrierprotein] Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäureacyltransferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäuresynthase(n), Fettsäurehydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäuresaturase(n), Fettsäureacetylenase(n), Lipoxygenase(n), Triacylglycerinlipase(n), Allenoxidsynthase(n), Hydroperoxidlyase(n), Fettsäureelongase(n), $\Delta 4$ -Desaturase(n), $\Delta 5$ -Desaturase(n), $\Delta 6$ -Desaturase(n), $\Delta 8$ -Desaturase(n), $\Delta 9$ -Desaturase(n), $\Delta 12$ -Desaturase(n), $\Delta 15$ -Desaturase(n), $\Delta 12$ - und $\Delta 15$ -Desaturase(n), $\omega 3$ -Desaturase, $\Delta 5$ -Elongase(n), $\Delta 6$ -Elongase(n) und $\Delta 9$ -Elongase(n).

[0064] Besonders bevorzugte Genkombinationen sind in den Tabellen 5 und 6 in den folgenden Beispielen aufgeführt.

[0065] Die Erfindung betrifft auch eine Wirtszelle, die das erfindungsgemäße Polynukleotid oder den erfindungsgemäßen Vektor umfasst.

[0066] Im Prinzip können Wirtszellen für die Zwecke der vorliegenden Erfindung alle eukaryotischen oder prokaryotischen Zellen sein. Sie können primäre Zellen aus Tieren, Pflanzen oder mehrzelligen Mikroorganismen sein, zum Beispiel aus solchen, die an anderer Stelle in der Beschreibung genannt sind. Der Begriff umfasst außerdem auch Zelllinien, die aus diesen Organismen erhalten werden können.

[0067] Wirtszellen für die Zwecke der Erfindung können jedoch auch einzellige Mikroorganismen, zum Beispiel Bakterien oder Pilze, sein. Besonders bevorzugte Mikroorganismen sind Pilze, die aus der Gruppe der Familien Chaetomiaceae, Choanephoraceae, Cryptococcaceae, Cunninghamellaceae, Dematiaceae, Hydnangiaceae (Gattung Laccaria), Moniliaceae, Mortierellaceae, Mucoraceae, Pythiaceae, Saccharomycetaceae, Saprolegniaceae, Schizosaccharomycetaceae, Sodariaceae oder Tuberculariaceae ausgewählt sind. Weitere bevorzugte Mikroorganismen sind aus der folgenden Gruppe ausgewählt: Choanephoraceae, wie die Gattungen Blakeslea, Choanephora, zum Beispiel die Gattungen und Spezies Blakeslea trispora, Choanephora cucurbitarum, Choanephora infundibulifera var. cucurbitarum, Hydnangiaceae (zum Beispiel die Gattung Laccaria, insbesondere die Spezies Laccaria bicolor), Mortierellaceae, wie die Gattung Mortierella, zum Beispiel die Gattungen und Spezies Mortierella isabellina, Mortierella polycephala, Mortierella ramanniana, Mortierella vinacea, Mortierella zonata, die Familie Mucorales, wie die Gattungen und Spezies Rhizopus oryzae, Rhizopus stolonifer, Fusarium graminearum, Pythiaceae, wie die Gattungen Phytium, Phytophthora, zum Beispiel die Gattungen und Spezies 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, Phy-

tophthora erythroseptica, Phytophthora lateralis, Phytophthora megasperma, Phytophthora nicotianae, Phytophthora nicotianae var. parasitica, Phytophthora palmivora, Phytophthora parasitica, Phytophthora syringae, Saccharomycetaceae, wie die Gattungen Hansenula, Pichia, Saccharomyces, Saccharomycodes, Yarrowia, zum Beispiel die Gattungen und Spezies Hansenula anomala, Hansenula californica, Hansenula canadensis, Hansenula capsulata, Hansenula ciferrii, Hansenula glucozyma, Hansenula henricii, Hansenula holstii, Hansenula minute, Hansenula nonfermentans, Hansenula philodendri, Hansenula polymorpha, Hansenula saturnus, Hansenula subpelliculosa, Hansenula wickerhamii, Hansenula wingei, Pichia alcoholophila, Pichia angusta, Pichia anomala, Pichia bisporea, 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 baillii, Saccharomyces bayanus, Saccharomyces bisporeus, 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 hienpiensis, Saccharomyces inusitatus, Saccharomyces italicus, Saccharomyces kluyveri, Saccharomyces krusei, Saccharomyces lactis, Saccharomyces marxianus, Saccharomyces microellipsoideus, Saccharomyces montanus, Saccharomyces norbensis, Saccharomyces oleaceus, Saccharomyces paradoxus, Saccharomyces pastorianus, Saccharomyces pretoriensis, Saccharomyces rosei, Saccharomyces rouxii, Saccharomyces uvarum, Saccharomycodes ludwigii, Yarrowia lipolytica, Schizosaccharomycetaceae, wie die Gattungen Schizosaccharomyces, z. B. die Spezies Schizosaccharomyces japonicus var. japonicus, Schizosaccharomyces japonicus var. versatilis, Schizosaccharomyces malidevorans, Schizosaccharomyces octosporus, Schizosaccharomyces pombe var. malidevorans, Schizosaccharomyces pombe var. pombe, Thraustochytriaceae, wie die Gattungen Althornia, Aplanochytrium, Japonochytrium, Schizochytrium, Thraustochytrium, z. B. die Spezies Schizochytrium aggregatum, Schizochytrium limacinum, Schizochytrium mangrovei, Schizochytrium minutum, Schizochytrium octosporum, Thraustochytrium aggregatum, Thraustochytrium amoeboides, Thraustochytrium antacticum, Thraustochytrium arudimentale, Thraustochytrium aureum, Thraustochytrium benthicola, Thraustochytrium globosum, Thraustochytrium indicum, Thraustochytrium kerguelense, Thraustochytrium kinnei, Thraustochytrium motivum, Thraustochytrium multirudimentale, Thraustochytrium pachydermum, Thraustochytrium proliferum, Thraustochytrium roseum, Thraustochytrium rossii, Thraustochytrium striatum oder Thraustochytrium visurgense.

[0068] Ebenfalls bevorzugt als Mikroorganismen sind Bakterien, die aus der Gruppe der Familien Bacillaceae, Enterobacteriaceae oder Rhizobiaceae ausgewählt sind. Besonders bevorzugt sollen die folgenden Bakterien erwähnt werden, die aus der folgenden Gruppe ausgewählt sind: Bacillaceae, wie die Gattung Bacillus, zum Beispiel die Gattungen und Spezies 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 lentimorbus, 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, zum Beispiel die Gattungen und Spezies Citrobacter amalonaticus, Citrobacter diversus, Citrobacter freundii, Citrobacter genomospecies, Citrobacter gilleni, Citrobacter intermedium, Citrobacter koseri, Citrobacter murlinae, 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 pyrifoliae, 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 cho-

leraesus subsp. choleraesus, *Salmonella choleraesus* subsp. *diarizonae*, *Salmonella choleraesus* subsp. *houtenae*, *Salmonella choleraesus* subsp. *indica*, *Salmonella choleraesus* subsp. *salamae*, *Salmonella dar-essalaam*, *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 plymuthensis*, *Serratia plymuthica*, *Serratia proteamaculans*, *Serratia proteamaculans* subsp. *quinovora*, *Serratia quinivorans* oder *Serratia rubidaea*; Rhizobiaceae, wie die Gattungen *Agrobacterium*, *Carbophilus*, *Chelatobacter*, *Ensifer*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, zum Beispiel die Gattungen und Spezies *Agrobacterium atlanticum*, *Agrobacterium ferrugineum*, *Agrobacterium gelatinovorum*, *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 saheli*, *Ensifer terangae*, *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 rhizoGene*, *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*, *Sinorhizobium meliloti*, *Sinorhizobium morelense*, *Sinorhizobium saheli* oder *Sinorhizobium xinjiangense*.

[0069] Weitere verwendbare Wirtszellen sind erläutert in: Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Expressionsstämme, die verwendet werden können, zum Beispiel solche mit einer niedrigeren Proteaseaktivität, sind beschrieben in: Gottesman, S., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 119–128. Dazu gehören Pflanzenzellen und bestimmte Gewebe, Organe und Teile von Pflanzen in ihren sämtlichen phänotypischen Formen, wie Antheren, Fasern, Wurzelhaaren, Stengeln, Embryonen, Calli, Kotelydonen, Petiolen, geerntetem Material, Pflanzengewebe, Reproduktionsgewebe und Zellkulturen, die aus der tatsächlichen transgenen Pflanze stammen und/oder zur Herstellung der transgenen Pflanze verwendet werden können.

[0070] Polynukleotide oder Vektoren können in die Wirtszelle, wie vorstehend beschrieben, mittels Transformations- oder Transfektionsverfahren eingebracht werden, die im Stand der Technik bekannt sind. Bedingungen und Medien für die Züchtung der Wirtszellen sind dem Fachmann ebenfalls bekannt.

[0071] Die erfindungsgemäße Wirtszelle umfasst vorzugsweise zusätzlich mindestens ein weiteres Enzym, das an der Biosynthese von Lipiden oder Fettsäuren beteiligt ist. Bevorzugte Enzyme sind bereits an anderer Stelle in der Beschreibung erwähnt. Das Enzym kann in der Wirtszelle in endogener Form vorhanden sein, d. h. die Wirtszelle exprimiert bereits natürlicherweise ein Gen, das für ein entsprechendes Enzym kodiert. Alternativ ist es auch möglich, in die Wirtszelle ein heterologes Polynukleotid einzubringen, das für das Enzym kodiert. Geeignete Verfahren und Mittel für die Expression eines heterologen Polynukleotids sind im Stand der Technik bekannt und sind hier in Zusammenhang mit den erfindungsgemäßen Polynukleotiden, Vektoren und Wirtszellen beschrieben.

[0072] Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids mit Desaturase-Aktivität, das folgende Schritte umfasst:

- (a) das Exprimieren eines erfindungsgemäßen Polynukleotids, wie vorstehend definiert, in einer Wirtszelle und
- (b) Erhalten des Polypeptids, das von dem Polynukleotid unter (a) kodiert wird, aus der Wirtszelle.

[0073] In diesem Zusammenhang kann das Polypeptid durch alle derzeitigen Reinigungsverfahren erhalten werden. Die Verfahren umfassen zum Beispiel Affinitätschromatographie, Molekularsiebchromatographie, Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) oder auch Proteinausfällung, wenn anwendbar mit spezifischen Antikörpern. Es ist zwar bevorzugt, aber das Verfahren muss nicht notwendigerweise eine reine Polypeptidpräparation bereitstellen.

[0074] Daher betrifft die Erfindung auch ein erfindungsgemäßes Polypeptid, das von dem erfindungsgemäßen Polynukleotid kodiert wird oder das durch das vorstehend genannte Verfahren erhältlich ist.

[0075] Der Begriff "Polypeptid" betrifft sowohl ein im Wesentlichen reines Polypeptid als auch eine Polypeptidzubereitung, die zusätzlich weitere Komponenten oder Verunreinigungen umfasst. Der Begriff wird auch für Fusionsproteine und Proteinaggregate verwendet, die das erfindungsgemäße Polypeptid und zusätzlich weitere Komponenten umfassen. Der Begriff betrifft auch chemisch modifizierte Polypeptide. In diesem Zusammenhang umfassen solche Modifikationen künstliche Modifikationen oder natürlicherweise vorkommende Modifikationen, zum Beispiel posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierung, Myristylierung, Glykosylierung und dergleichen. Die Begriffe "Polypeptid", "Peptid" und "Protein" sind austauschbar und werden in der Beschreibung und im Stand der Technik so verwendet. Die erfindungsgemäßen Polypeptide haben die vorstehend genannten biologischen Aktivitäten, d. h. Dehydratase-Aktivitäten, und können die Biosynthese von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs), vorzugsweise der langkettigen PUFAs (LCPUFAs), beeinflussen, wie hier beschrieben.

[0076] Die Erfindung umfasst auch einen Antikörper, der das erfindungsgemäße Polypeptid spezifisch erkennt.

[0077] Antikörper gegen das erfindungsgemäße Polypeptid können mithilfe bekannter Verfahren hergestellt werden, wobei gereinigtes Polypeptid oder Fragmente davon mit geeigneten Epitopen als Antigen verwendet wird/werden. Geeignete Epitope können mithilfe bekannter Algorithmen zur Bestimmung der Antigenität auf Basis der hier bereitgestellten Aminosäuresequenzen der erfindungsgemäßen Polypeptide bestimmt werden. Die in Frage kommenden Polypeptide oder Fragmente können dann synthetisiert oder durch Rekombinationstechniken erhalten werden. Nachdem geeignete Tiere, vorzugsweise Säuger, zum Beispiel Hasen, Ratten oder Mäuse, immunisiert worden sind, können die Antikörper dann aus dem Serum unter Verwendung bekannter Verfahren erhalten werden. Alternativ können monoklonale Antikörper oder Antikörperfragmente mit bekannten Verfahren bereitgestellt werden; siehe zum Beispiel Harlow und Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988, oder Köhler und Milstein, Nature 256 (1975), 495, und Golfre, Meth. Enzymol. 73 (1981), 3.

[0078] Die Antikörper haben vorzugsweise die Form monoklonaler oder polyklonaler Antikörper, einkettiger Antikörper oder chimärer Antikörper und von Fragmenten davon, wie Fab, Fu oder scFv. Weitere Antikörper innerhalb der Bedeutung der Erfindung sind bispezifische Antikörper, synthetische Antikörper oder ihre chemisch modifizierten Derivate.

[0079] Die erfindungsgemäßen Antikörper erkennen spezifisch die erfindungsgemäßen Polypeptide, d. h. sie kreuzreagieren nicht signifikant mit anderen Proteinen. Zum Beispiel reagiert ein erfindungsgemäßer Antikörper, der spezifisch eine $\Delta 12$ -Desaturase bindet, nicht mit einer $\Delta 6$ -Desaturase. Dies kann mithilfe von im Stand der Technik bekannten Verfahren getestet werden. Die Antikörper können zum Beispiel für die Zwecke von Nachweisreaktionen, Immunfällung, Immunhistochemie oder Proteinreinigung (zum Beispiel Affinitätschromatographie) verwendet werden.

[0080] Die Erfindung betrifft außerdem einen transgenen, nicht-menschlichen Organismus, das erfindungsgemäße Polynukleotid, den erfindungsgemäßen Vektor oder die erfindungsgemäße Wirtszelle umfasst. Der transgene, nicht-menschliche Organismus hat vorzugsweise die Form eines Tiers, einer Pflanze oder eines multizellulären Mikroorganismus.

[0081] Der Begriff "transgen" wird so verstanden, dass ein heterologes Polynukleotid, d. h. ein Polynukleotid, das nicht natürlicherweise in dem jeweiligen Organismus vorkommt, in den Organismus eingebracht wird. Das kann entweder mittels zufallsgemäßer Insertion des Polynukleotids oder mittels homologer Rekombination erreicht werden. Natürlich ist es auch möglich, den erfindungsgemäßen Vektor anstelle des Polynukleotids einzubringen. Verfahren zum Einbringen von Polynukleotiden oder Vektoren für die Zwecke einer zufallsgemäßen Insertion oder homologen Rekombination sind im Stand der Technik bekannt und zudem hier nachstehend detaillierter beschrieben. Wirtszellen, die das Polynukleotid oder den Vektor umfassen, können ebenfalls in einen Organismus eingebracht werden und so kann ein transgener Organismus hergestellt werden. In einem solchen Fall hat ein derartiger Organismus die Form eines chimären Organismus, wobei nur solche Zellen, die von den eingebrachten Zellen stammen, transgen sind, d. h. das heterologe Polynukleotid umfassen.

[0082] Die transgenen nicht-menschlichen Organismen sind vorzugsweise ölproduzierende Organismen, d. h. Organismen, die man zur Herstellung von Ölen verwendet, zum Beispiel Pilze, wie Rhizopus oder Thraustochytrium, Algen, wie Euglena, Nephroselmis, Pseudoscurfielda, Prasinococcus, Scherffelia, Tetraselmis, Mantoniella, Ostreococcus, Crypthecodinium, Phaeodactylum, oder Diatomeen, wie Pythium oder Phycophthora, oder Pflanzen.

[0083] Transgene Pflanzen, die verwendet werden können, sind im Prinzip sämtliche Pflanzen, d. h. sowohl zweikeimblättrige als auch einkeimblättrige Pflanzen. Sie nehmen vorzugsweise die Form von Ölpflanzen an, die große Mengen an Lipidverbindungen umfassen, wie Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, Färberdistel (*Carthamus tinctoria*), Mohn, Senf, Hanf, Rizinusölpflanze, Olive, Sesam, Calendula, Punica, Nachtkerze, Königskerze, Distel, Wildrosen, Haselnuss, Mandel, Macadamia, Avocado, Lorbeer, Kürbis/Sqash, Leinsamen, Sojabohne, Pistazien, Borretsch, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss oder Walnuss) oder Feldfrüchte, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Baumwolle, Cassava, Pfeffer, Tagetes, Solanaceae-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Spezies, Erbse, Alfalfa, oder buschige Pflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Spezies und ausdauernde Gräser und Futterpflanzen. Bevorzugte erfindungsgemäße Pflanzen sind Ölpflanzen, wie Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, Färberdistel, Mohn, Senf, Hanf, Rizinusölpflanze, Olive, Calendula, Punica, Nachtkerze, Kürbis/Sqash, Leinsamen, Sojabohne, Borago, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss). Besonders bevorzugt sind Pflanzen, die einen hohen Gehalt an C18:2- und/oder C18:3-Fettsäuren haben, wie Sonnenblume, Tabak, Königskerze, Sesam, Baumwolle, Kürbis/Sqash, Mohn, Nachtkerze, Walnuss, Leinsamen, Hanf, Distel oder Färberdistel. Ganz besonders bevorzugte Pflanzen sind Pflanzen, wie Färberdistel, Sonnenblume, Mohn, Nachtkerze, Walnuss, Leinsamen oder Hanf. Im Prinzip sind jedoch alle Pflanzen geeignet, die in der Lage sind, Fettsäuren zu synthetisieren, wie alle zweikeimblättrigen oder einkeimblättrigen Pflanzen, Algen oder Moose. Vorteilhafte Pflanzen werden aus der Gruppe der folgenden Pflanzenfamilien ausgewählt: Adelotheceaceae, Anacardiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Betulaceae, Boraginaceae, Brassicaceae, Bromeliaceae, Caricaceae, Cannabaceae, Convolvulaceae, Chenopodiaceae, Cryptocodiaceae, Cucurbitaceae, Ditrichaceae, Elaeagnaceae, Ericaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Geraniaceae, Gramineae, Juglandaceae, Lauraceae, Leguminosae, Linaceae, Prasinophyceae, oder Gemüsepflanzen oder Zierpflanzen, wie Tagetes.

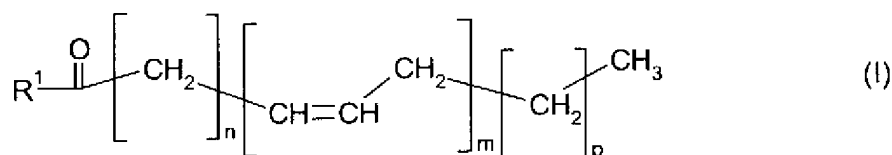
[0084] Beispiele, die besonders bevorzugt erwähnt werden können, sind die folgenden Pflanzen, die aus der Gruppe ausgewählt werden, bestehend aus: Adelotheceaceae, wie die Gattung *Physcomitrella*, zum Beispiel die Gattung und Spezies *Physcomitrella patens*, Anacardiaceae, wie die Gattung *Pistacia*, *Mangifera*, *Anacardium*, zum Beispiel die Gattung und Spezies *Pistacia vera* [Pistazie], *Mangifera indica* [Mango] oder *Anacardium occidentale* [Cashew], Asteraceae, wie die Gattungen *Calendula*, *Carthamus*, *Centaurea*, *Cichorium*, *Cynara*, *Helianthus*, *Lactuca*, *Locusta*, *Tagetes*, *Valeriana*, zum Beispiel die Gattung und Spezies *Calendula officinalis* [Gemeine Ringelblume], *Carthamus tinctorius* [Färberdistel], *Centaurea cyanus* [Kornblume], *Cichorium intybus* [Gemeine Wegwarte], *Cynara scolymus* [Artischocke], *Helianthus annuus* [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* [Salatgemüse], *Tagetes lucida*, *Tagetes erecta* oder *Tagetes tenuifolia* [Afrikanische oder Französische Studentenblume], Apiaceae, wie die Gattung *Daucus*, zum Beispiel die Gattung und Spezies *Daucus carota* [Karotte], Betulaceae, wie die Gattung *Corylus*, zum Beispiel die Gattungen und Spezies *Corylus avellana* oder *Corylus colurna* [Haselnuss], Boraginaceae, wie die Gattung *Borago*, zum Beispiel die Gattung und Spezies *Borago officinalis* [Borretsch], Brassicaceae, wie die Gattungen *Brassica*, *Camelina*, *Melanosinapis*, *Sinapis*, *Arabadopsis*, zum Beispiel die Gattungen und Spezies *Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp. [Raps], *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* [Gemüse Kohl] oder *Arabadopsis thaliana*, Bromeliaceae, wie die Gattungen *Ananas*, *Bromelia* (*Ananas*), zum Beispiel die Gattungen und Spezies *Ananas comosus*, *Ananas ananas* oder *Bromelia comosa* [Ananas], Caricaceae, wie die Gattung *Carica*, wie die Gattung und Spezies *Carica papaya* [Indianerbanane], Cannabaceae, wie die Gattung *Cannabis*, wie die Gattung und Spezies *Cannabis sativa* [Hanf], Convolvulaceae, wie die Gattungen *Ipomea*, *Convolvulus*, zum Beispiel die Gattungen und Spezies *Ipomoea batatas*, *Ipomoea pandurata*, *Convolvulus batatas*, *Convolvulus tiliaceus*, *Ipomoea fastigiata*, *Ipomoea tiliacea*, *Ipomoea triloba* oder *Convolvulus panduratus* [Süßkartoffel, Batate], Chenopodiaceae, wie die Gattung *Beta*, wie die Gattungen und Spezies *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], Cryptocodiaceae, wie die Gattung *Cryptocodium*, zum Beispiel die Gattung und Spezies *Cryptocodium cohnii*, Cucurbitaceae, wie die Gattung *Cucurbita*, zum Beispiel die Gattungen und Spezies *Cucurbita maxima*, *Cucurbita mixta*, *Cucurbita pepo* oder *Cucurbita moschata* [Kürbis/Sqash], Cymbellaceae, wie die Gattungen *Amphora*, *Cymbella*, *Okedenia*, *Phaeodactylum*, *Reimeria*, zum Beispiel die Gattung und Spezies *Phaeodactylum tricorutum*, Ditrichaceae, wie die Gattungen *Ditrichaceae*, *Astomiopsis*, *Ceratodon*, *Chrysoblastella*, *Ditrichum*, *Distichium*, *Eccremidium*, *Lophidion*, *Philibertiella*, *Pleuridium*, *Saelania*, *Trichodon*, *Skottsbergia*, zum Beispiel die Gattungen und Spezies *Ceratodon antarcticus*, *Ceratodon columbiae*, *Ceratodon heterophyllum*, *Ceratodon purpurascens*, *Ceratodon purpureus*, *Ceratodon purpureus* 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 montanum*, *Ditrichum pallidum*, *Ditrichum punctulatum*, *Ditrichum pusillum*, *Ditrichum pusillum* var. *tortile*, *Ditrichum rynchostegium*, *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*, *Pleuridium ravenelii*, *Pleuridium subulatum*, *Saelania glaucescens*, *Trichodon borealis*, *Trichodon cylindricus* oder *Trichodon cylindricus* var. *oblongus*, *Elaeagnaceae*, wie die Gattung *Elaeagnus*, zum Beispiel die Gattung und Spezies *Olea europaea* [Olive], *Ericaceae*, wie die Gattung *Kalmia*, zum Beispiel die Gattungen und Spezies *Kalmia latifolia*, *Kalmia angustifolia*, *Kalmia microphylla*, *Kalmia polifolia*, *Kalmia occidentalis*, *Cistus chamaerhodendros* oder *Kalmia lucida* [Berglorbeer], *Euphorbiaceae*, wie die Gattungen *Manihot*, *Janipha*, *Jatropha*, *Ricinus*, zum Beispiel die Gattungen und Spezies *Manihot utilissima*, *Janipha manihot*, *Jatropha manihot*, *Manihot aipil*, *Manihot dulcis*, *Manihot manihot*, *Manihot melanobasis*, *Manihot esculenta* [Cassava] oder *Ricinus communis* [Rizinus-ölpflanze], *Fabaceae*, wie die Gattungen *Pisum*, *Albizia*, *Cathormion*, *Feuillea*, *Inga*, *Pithecolobium*, *Acacia*, *Mimosa*, *Medicago*, *Glycine*, *Dalichos*, *Phaseolus*, *Sojabohne*, zum Beispiel die Gattungen und Spezies *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 berteriana*, *Acacia julibrissin*, *Acacia nemu*, *Albizia nemu*, *Feuillea julibrissin*, *Mimosa julibrissin*, *Mimosa speciosa*, *Sericandra julibrissin*, *Acacia lebbeck*, *Acacia macrophylla*, *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* [Sojabohne], *Funariaceae*, wie die Gattungen *Aphanorrhagma*, *Entosthodon*, *Funaria*, *Physcomitrelia*, *Physcomitrium*, zum Beispiel die Gattungen und Spezies *Aphanorrhagma serratum*, *Entosthodon attenuatus*, *Entosthodon bolanderi*, *Entosthodon bonplandii*, *Entosthodon californicus*, *Entosthodon drummondii*, *Entosthodon jamesonii*, *Entosthodon leibergii*, *Entosthodon neoscoticus*, *Entosthodon rubrissetus*, *Entosthodon spathulifolius*, *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 hygrometrica* var. *calvescens*, *Funaria hygrometrica* var. *convoluta*, *Funaria hygrometrica* var. *muralis*, *Funaria hygrometrica* var. *utahensis*, *Funaria microstoma*, *Funaria microstoma* var. *obtusifolia*, *Funaria muhlenbergii*, *Funaria orcuttii*, *Funaria plano-convexa*, *Funaria polaris*, *Funaria ravenelii*, *Funaria rubrisseta*, *Funaria serrata*, *Funaria sonora*, *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*, zum Beispiel die Gattungen und Spezies *Cocos nucifera*, *Pelargonium grossularioides* oder *Oleum cocois* [Kokosnuss], *Gramineae*, wie die Gattung *Saccharum*, zum Beispiel die Gattung und Spezies *Saccharum officinarum*, *Juglandaceae*, wie die Gattungen *Juglans*, *Wallia*, zum Beispiel die Gattungen und Spezies *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*, zum Beispiel die Gattungen und Spezies *Laurus nobilis* [Lorbeer], *Persea americana*, *Persea gratissima* oder *Persea persea* [Avocado], *Leguminosae*, wie die Gattung *Arachis*, zum Beispiel die Gattung und Spezies *Arachis hypogaea* [Erdnuss], *Linaceae*, wie die Gattungen *Linum*, *Adenolinum*, zum Beispiel die Gattungen und Spezies *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* [Leinsamen], *Lytharieae*, wie die Gattung *Punica*, zum Beispiel die Gattung und Spezies *Punica granatum* [Granatapfel], *Malvaceae*, wie die Gattung *Gossypium*, zum Beispiel die Gattungen und Spezies *Gossypium hirsutum*, *Gossypium arboreum*, *Gossypium barbadense*, *Gossypium herbaceum* oder *Gossypium thurberi* [Baumwolle], *Marchantiaceae*, wie die Gattung *Marchantia*, zum Beispiel die Gattungen und Spezies *Marchantia berteriana*, *Marchantia foliacea*, *Marchantia macropora*, *Musaceae*, wie die Gattung *Musa*, zum Beispiel die Gattungen und Spezies *Musa nana*, *Musa acuminata*, *Musa paradisiaca*, *Musa* spp. [Banane], *Onagraceae*, wie die Gattungen *Camissonia*, *Oenothera*, zum Beispiel die Gattungen und Spezies *Oenothera biennis* oder *Camissonia brevipes* [Nachtkerze], *Palmae*, wie die Gattung *Elaeis*, zum Beispiel die Gattung und Spezies *Elaeis guineensis* [Ölpalme], *Papaveraceae*, wie die Gattung *Papaver*, zum Beispiel die Gattungen und Spezies *Papaver orientale*, *Papaver rhoeas*, *Papaver dubium* [Mohn], *Pedaliaceae*, wie die Gattung *Sesamum*, zum Beispiel die Gattung und Spezies *Sesamum indicum* [Sesam], *Piperaceae*, wie die Gattungen *Piper*, *Artanthe*, *Peperomia*, *Steffensia*, zum Beispiel die Gattungen und Spezies

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, zum Beispiel die Gattungen und Spezies 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 byzantine, 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, 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 milieum, Panicum militaceum [Echte Hirse], Oryza sativa, Oryza latifolia [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, Rhodella, Rhodosorus, Vanhoeffenia, zum Beispiel die Gattung und Spezies Porphyridium cruentum, Proteaceae, wie die Gattung Macadamia, zum Beispiel die Gattung und Spezies Macadamia intergrifolia [Macadamia], Prasinophyceae, wie die Gattungen Nephroselmis, Prasinococcus, Scherffelia, Tetraselmis, Mantoniella, Ostreococcus, zum Beispiel die Gattungen und Spezies Nephroselmis olivacea, Prasinococcus capsulatus, Scherffelia dubia, Tetraselmis chui, Tetraselmis suecica, Mantoniella squamata, Ostreococcus tauri, Rubiaceae, wie die Gattung Coffea, zum Beispiel die Gattungen und Spezies Coffea spp., Coffea arabica, Coffea canephora oder Coffea liberica [Kaffee], Scrophulariaceae, wie die Gattung Verbascum, zum Beispiel die Gattungen und Spezies 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, zum Beispiel die Gattungen und Spezies 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], Lycopersicon esculentum, Lycopersicon lycopersicum, Lycopersicon pyriforme, Solanum integrifolium oder Solanum lycopersicum [Tomate], Sterculiaceae, wie die Gattung Theobroma, zum Beispiel die Gattung und Spezies Theobroma cacao [Kakao] oder Theaceae, wie die Gattung Camellia, zum Beispiel die Gattung und Spezies Camellia sinensis [Tee].

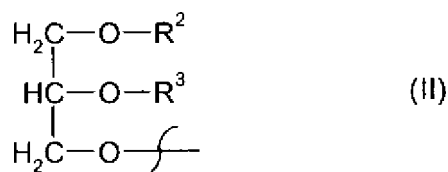
[0085] Multizelluläre Mikroorganismen, die als transgene nicht-menschliche Organismen eingesetzt werden können, sind vorzugsweise Protisten oder Diatomeen, die ausgewählt werden aus der Gruppe der Familien Dinophyceae, Turaniellidae oder Oxytrichidae, wie die Gattungen und Spezies: Cryptocodium cohnii, Phaeodactylum tricornerum, Stylonychia mytilus, Stylonychia pustulata, Stylonychia putrina, Stylonychia notophora, Stylonychia sp., Colpidium campylum oder Colpidium sp.

[0086] Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung einer Substanz, die die hier nachstehend in der allgemeinen Formel I gezeigte Struktur aufweist



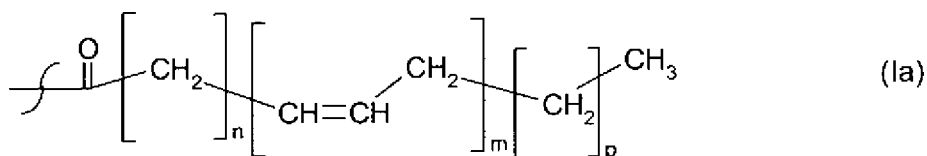
wobei die Variablen und Substituenten Folgende sind:

R¹ = Hydroxyl, Coenzym A (Thioester), Lysophosphatidylcholin, Lysophosphatidylethanolamin, Lysophosphatidylglycerin, Lysodephosphatidylglycerin, Lysophosphatidylserin, Lysophosphatidylinositol, Sphingobase oder ein Rest der Formel II



R² = Wasserstoff, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol oder ein gesättigtes oder ungesättigtes C₂- bis C₂₄-Alkylcarbonyl,

R³ = Wasserstoff, ein gesättigtes oder ungesättigtes C₂- bis C₂₄-Alkylcarbonyl oder R² und R³ sind unabhängig von einander ein Rest der Formel Ia:



in der

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

und wobei das Verfahren die Züchtung (i) einer erfindungsgemäßen Wirtszelle oder (ii) eines erfindungsgemäßen transgenen, nicht-menschlichen Organismus unter Bedingungen umfasst, die die Biosynthese der Substanz gestatten. Vorzugsweise wird die vorstehend genannte Substanz in einer Menge von mindestens 1 Gew.-%, bezogen auf den Gesamt-Lipidgehalt in der Wirtszelle oder dem transgenen Organismus, bereitgestellt.

[0087] Bevorzugte Alkylreste R², die genannt werden können, sind substituierte oder unsubstituierte, gesättigte 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 oder n-Tetracosanylcarbonyl, die eine oder mehrere Doppelbindungen umfassen. 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 eine oder mehrere Doppelbindungen umfassen, sind bevorzugt. Besonders bevorzugt werden 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 eine oder mehrere Doppelbindungen umfassen. Ganz besonders bevorzugt sind gesättigte oder ungesättigte C₁₆-C₂₂-Alkylcarbonylreste, wie C₁₆-Alkylcarbonyl-, C₁₈-Alkylcarbonyl-, C₂₀-Alkylcarbonyl- oder C₂₂-Alkylcarbonylreste, die eine oder mehrere Doppelbindungen umfassen. Diese bevorzugten Reste können zwei, drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen umfassen. Die besonders bevorzugten Reste mit 20 oder 22 Kohlenstoffatomen in der Fettsäurekette umfassen bis zu sechs Doppelbindungen, vorzugsweise drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen, besonders bevorzugt fünf oder sechs Doppelbindungen. Sämtliche vorstehend genannten Reste stammen von den entsprechenden Fettsäuren.

[0088] Bevorzugte Alkylreste R³, die genannt werden können, sind substituierte oder unsubstituierte, gesättigte 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 oder n-Tetracosanylcarbonyl, die eine oder mehrere Doppelbindungen umfassen. 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 eine oder mehrere Doppelbindungen umfassen, 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 eine oder mehrere Doppelbindungen umfassen. Ganz besonders bevorzugt sind gesättigte oder ungesättigte C₁₆-C₂₂-Alkylcarbonylreste, wie C₁₆-Alkylcarbonyl-, C₁₈-Alkylcarbonyl-, C₂₀-Alkylcarbonyl- oder C₂₂-Alkylcarbonylreste, die eine oder mehrere Doppelbindungen umfassen. Diese bevorzugten Reste können zwei, drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen umfassen. Die besonders bevorzugten Reste mit 20 oder 22 Kohlenstoffatomen in der Fettsäurekette umfassen bis zu sechs Doppelbindungen, vorzugsweise drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen, besonders bevorzugt fünf oder sechs Doppelbindungen. Sämtliche vorstehend genannten Reste stammen von den entsprechenden Fettsäuren.

[0089] Die vorstehend genannten Reste R¹, R² und R³ können mit Hydroxyl- und/oder Epoxygruppen substituiert sein und/oder können Dreifachbindungen umfassen.

[0090] Die in dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren umfassen vorteilhafterweise mindestens zwei, vorteilhafterweise drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen. Die Fettsäuren umfassen besonders vorteilhafterweise vier, fünf oder sechs Doppelbindungen. Die bei dem Verfahren hergestellten Fettsäuren weisen vorteilhafterweise 18, 20 oder 22 C-Atome in der Fettsäurekette auf; die Fettsäuren umfassen vorzugsweise 20 oder 22 Kohlenstoffatome in der Fettsäurekette. Gesättigte Fettsäuren werden vorteilhafterweise in vernachlässigbarem Maß oder gar nicht mit den bei dem Verfahren verwendeten Nukleinsäuren umgesetzt. In vernachlässigbarem Maß soll so verstanden werden, dass es bedeutet, dass die gesättigten Fettsäuren mit weniger als 5% der Aktivität, vorteilhafterweise weniger als 3%, besonders vorteilhafterweise mit weniger als 2%, ganz besonders bevorzugt mit weniger als 1, 0,5, 0,25 oder 0,125% im Vergleich zu mehrfach ungesättigten Fettsäuren umgesetzt werden. Diese Fettsäuren, die produziert worden sind, können bei dem Verfahren als einzelnes Produkt produziert werden oder in einem Fettsäuregemisch vorliegen.

[0091] Die Reste R^2 oder R^3 in den allgemeinen Formeln II können identisch oder nicht identisch sein, wobei R^2 und R^3 vorzugsweise ein gesättigtes oder ungesättigtes C_{18} - C_{22} -Alkylcarbonyl; besonders bevorzugt ein ungesättigtes C_{18} -, C_{20} - oder C_{22} -Alkylcarbonyl mit mindestens zwei Doppelbindungen sind.

[0092] Die bei dem Verfahren produzierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind vorteilhafterweise in Membranlipiden und/oder Triacylglyceriden gebunden, können aber in den Organismen auch als freie Fettsäuren oder auch in Form anderer Fettsäureester gebunden vorkommen. In diesem Zusammenhang können sie als "reine Produkte" oder auch vorteilhafterweise in Form von Gemischen verschiedener Fettsäuren oder Gemischen verschiedener Glyceride vorhanden sein. Die verschiedenen Fettsäuren, die in den Triacylglyceriden gebunden sind, können von kurzkettigen Fettsäuren mit 4 bis 6 C-Atomen, Fettsäuren mittlerer Kettenlänge mit 8 bis 12 C-Atomen oder langkettigen Fettsäuren mit 14 bis 24 C-Atomen stammen; bevorzugt sind langkettige Fettsäuren, stärker bevorzugt langkettige Fettsäuren LCPUFA von C_{18} -, C_{20} - und/oder C_{22} -Fettsäuren.

[0093] Das erfindungsgemäße Verfahren liefert vorteilhafterweise Fettsäureester mit mehrfach ungesättigten C_{18} -, C_{20} - und/oder C_{22} -Fettsäuremolekülen mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäureester, vorteilhafterweise mit mindestens drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen im Fettsäureester, besonders vorteilhafterweise mit mindestens fünf oder sechs Doppelbindungen im Fettsäureester, und führt vorteilhafterweise zur Synthese von Linolsäure (= LA, $C_{18}:2^{\Delta 9,12}$), γ -Linolensäure (= GLA, $C_{18}:3^{\Delta 6,9,12}$) Stearidonsäure (= SDA, $C_{18}:4^{\Delta 6,9,12,15}$), Dihomo- γ -linolensäure (= DGLA, $20:3^{\Delta 8,11,14}$), $\omega 3$ -Eicasatetraensäure (= ETA, $C_{20}:4^{\Delta 5,8,11,14}$), Arachidonsäure (ARA, $C_{20}:4^{\Delta 5,6,11,14}$), Eicosapentaensäure (EPA, $C_{20}:5^{\Delta 5,8,11,14,17}$) $\omega 6$ -Docosapentaensäure ($C_{22}:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$), $\omega 6$ -Docosatetraensäure ($C_{22}:4^{\Delta 7,10,13,16}$), $\omega 3$ -Docosapentaensäure (= DPA, $C_{22}:5^{\Delta 7,10,13,16,19}$) Docosahexaensäure (= DHA, $C_{22}:6^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$) oder deren Gemischen, vorzugsweise ARA, EPA und/oder DHA. $\omega 3$ -Fettsäuren, wie EPA und/oder DHA, werden ganz besonders bevorzugt produziert.

[0094] Die Fettsäureester mit mehrfach ungesättigten C_{18} -, C_{20} - und/oder C_{22} -Fettsäuremolekülen können in Form eines Öls oder Lipids, zum Beispiel in Form von Verbindungen, wie Sphingolipiden, Phosphoglyceriden, Lipiden, Glycolipiden, wie Glycosphingolipiden, Phospholipiden, wie Phosphatidylethanoamin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerin, Phosphatidylinositol oder Diphosphatidylglycerin, Monoacylglyceriden, Diacylglyceriden, Triacylglyceriden oder anderen Fettsäureestern, wie den Acyl-Coenzym A-Estern, die die mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei, drei, vier, fünf oder sechs, vorzugsweise fünf oder sechs Doppelbindungen umfassen, aus den Organismen, die für die Herstellung der Fettsäureester verwendet worden sind, isoliert werden; vorteilhafterweise werden sie in Form von ihrer Diacylglyceride, Triacylglyceride und/oder in Form von Phosphatidylcholin, besonders bevorzugt in Form der Triacylglyceride isoliert. Zusätzlich zu diesen Estern liegen die mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den Organismen, vorteilhafterweise den Pflanzen, auch als freie Fettsäuren oder in anderen Verbindungen gebunden vor. In der Regel liegen die verschiedenen vorstehend genannten Verbindungen (Fettsäureester und freie Fettsäuren) in den Organismen mit einer ungefähren Verteilung von 80 bis 90 Gew.-% an Triglyceriden, 2 bis 5 Gew.-% an Diglyceriden, 5 bis 10 Gew.-% an Monoglyceriden, 1 bis 5 Gew.-% an freien Fettsäuren, 2 bis 8 Gew.-% an Phospholipiden vor, wobei die Gesamtmenge der verschiedenen Verbindungen 100 Gew.-% ausmacht.

[0095] Das erfindungsgemäße Verfahren ergibt die produzierten LCPUFAs in einem Gehalt von mindestens 3 Gew.-%, vorteilhafterweise mindestens 5 Gew.-%, vorzugsweise mindestens 8 Gew.-%, besonders bevorzugt mindestens 10 Gew.-%, am stärksten bevorzugt mindestens 15 Gew.-%, bezogen auf die Gesamt-Fettsäuren in den transgenen Organismen, vorteilhafterweise in einer transgenen Pflanze. In diesem Zusammenhang ist es vorteilhaft, wenn C_{18} - und/oder C_{20} -Fettsäuren umgewandelt werden, die in den Wirtsorganismen zu mindestens 10%, vorteilhafterweise zu mindestens 20%, besonders vorteilhafterweise zu mindestens 30%, am vorteilhaftesten zu mindestens 40% vorliegen, um die entsprechenden Produkte, wie DPA oder DHA, um nur zwei Beispiele zu nennen, zu erhalten. Die Fettsäuren werden vorteilhafterweise in gebundener Form produ-

ziert. Diese ungesättigten Fettsäuren können mithilfe der in dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren an der sn1-, sn2- und/oder sn3-Position der vorteilhafterweise produzierten Triglyceride positioniert sein. Weil eine Vielzahl von Reaktionsschritten mit den Ausgangsverbindungen Linolsäure (C18:2) und Linolensäure (C18:3) in dem erfindungsgemäßen Verfahren durchgeführt wird, werden die Endprodukte des Verfahrens, wie zum Beispiel Arachidonsäure (ARA), Eicosapentaensäure (EPA), ω 6-Docosapentaensäure oder DHA, nicht als absolut reine Produkte erhalten; kleinere Spuren der Vorstufen sind immer im Endprodukt vorhanden. Wenn zum Beispiel sowohl Linolsäure als auch Linolensäure in dem Ausgangsorganismus und der Ausgangspflanze vorliegen, liegen die Endprodukte, wie ARA, EPA oder DHA, als Gemische vor. Die Vorstufen sollten vorteilhafterweise nicht mehr als 20 Gew.-%, vorzugsweise nicht mehr als 15 Gew.-%, besonders bevorzugt nicht mehr als 10 Gew.-%, am stärksten bevorzugt nicht mehr als 5 Gew.-%, bezogen auf die Menge des in Frage kommenden Endprodukts, ausmachen. Vorteilhafterweise werden nur ARA, EPA oder nur DHA, gebunden oder als freie Säure, als Endprodukte in einer transgenen Pflanze bei dem erfindungsgemäßen Verfahren produziert. Wenn die Verbindungen ARA, EPA und DHA gleichzeitig produziert werden, werden sie vorteilhafterweise in einem Verhältnis von mindestens 3:2:1 (EPA:ARA:DHA) produziert.

[0096] Fettsäureester oder Fettsäuregemische, die mithilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens produziert werden, umfassen vorteilhafterweise 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, in jedem Fall bezogen auf 100% und auf den Gesamt-Fettsäuregehalt der Organismen. Eine vorteilhafte mehrfach ungesättigte Fettsäure, die in den Fettsäureestern oder Fettsäuregemischen vorliegt, ist vorzugsweise Eicosapentaensäure. Außerdem umfassen die Fettsäureester oder Fettsäuregemische, die durch das erfindungsgemäße Verfahren produziert worden sind, vorteilhafterweise Fettsäuren, die aus der Gruppe der folgenden Fettsäuren ausgewählt sind: Erucasäure (13-Docosäure), Sterculinsäure (9,10-Methylenoctadec-9-ensäure), Malvaliasäure (8,9-Methylenheptadec-8-ensäure), Chaulmoograsäure (Cyclopentendodecansäure), Furanfettsäure (9,12-Epoxyoctadeca-9,11-diensäure), Vernoniasäure (9,10-Epoxyoctadec-12-ensäure), Tarininsäure (6-Octadecinsäure), 6-Nonadecinsäure, Santalbinsäure (11-Octadecen-9-ensäure), 6,9-Octadeceninsäure, Pyrulinsäure (10-Heptadecen-8-ensäure), Crepeninsäure (9-Octadecen-12-ensäure), 13,14-Dihydrooropheinsäure, Octadecen-13-en-9,11-diensäure, Petroselinsäure (cis-6-Octadecensäure), 9c,12t-Octadecadiensäure, Calendulinsäure (8t10t12c-Octadecatriensäure), Catalpinsäure (9t11t13c-Octadecatriensäure), Eleostearinsäure (9c11t13t-Octadecatriensäure), Jacarinsäure (8c10t12c-Octadecatriensäure), Punicinsäure (9c11t13c-Octadecatriensäure), Parinarsäure (9c11t13t15c-Octadecatetraensäure), Pinolensäure (all-cis-5,9,12-Octadecatriensäure), Laballensäure (5,6-Octadecadienallensäure), Ricinoleinsäure (12-Hydroxyoleinsäure) und/oder Coriolinsäure (13-Hydroxy-9c,11t-octadecadiensäure). Die vorstehend genannten Fettsäuren findet man in der Regel vorteilhafterweise nur in Spuren in den Fettsäureestern oder Fettsäuregemischen, die durch das erfindungsgemäße Verfahren produziert werden, d. h. dass sie, bezogen auf die Gesamt-Fettsäuren, zu weniger als 30%, vorzugsweise 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% vorkommen. Die Fettsäureester oder Fettsäuregemische, die durch das erfindungsgemäße Verfahren produziert werden, umfassen vorteilhafterweise weniger als 0,1%, bezogen auf die Gesamt-Fettsäuren, oder keine Butyrinsäure, kein Cholesterin, keine Clupanodonsäure (= Docosapentaensäure, C22:5 ^{Δ 4,8,12,15,21}) und keine Nisinsäure (Tetracosahexaensäure, C23:6 ^{Δ 3,8,12,15,18,21}) Aufgrund der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen oder der Nukleinsäuresequenzen, die bei dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden, kann eine Zunahme in der Ausbeute an mehrfach ungesättigten Fettsäuren von mindestens 50%, vorteilhafterweise von mindestens 80%, besonders vorteilhafterweise von mindestens 100%, ganz besonders vorteilhafterweise von mindestens 150%, im Vergleich zu dem nicht-transgenen Ausgangsorganismus, zum Beispiel einer Hefe, einer Alge, einem Pilz oder einer Pflanze, wie Arabidopsis oder Leinsamen, in einem Vergleich mittels GC-Analyse erhalten werden.

[0097] Chemisch reine mehrfach ungesättigte Fettsäuren oder Fettsäurezusammensetzungen können ebenfalls durch die vorstehend beschriebenen Verfahren hergestellt werden. Zu diesem Zweck werden die Fettsäuren oder die Fettsäurezusammensetzungen aus dem Organismus, wie den Mikroorganismen oder den Pflanzen, oder dem Kulturmedium, in dem oder auf dem die Organismen gezüchtet worden sind, oder aus dem Organismus und dem Kulturmedium auf bekannte Weise isoliert, zum Beispiel über Extraktion, Destillation, Kristallisation, Chromatographie oder Kombinationen dieser Verfahren. Diese chemisch reinen Fettsäuren oder Fettsäurezusammensetzungen sind für Anwendungen auf dem Nahrungsmittelindustrie-Sektor dem Kosmetikindustrie-Sektor und besonders auf dem Sektor der pharmakologischen Industrie vorteilhaft.

[0098] Im Prinzip können sämtliche Gene des Fettsäure- oder Lipidmetabolismus in den Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren verwendet werden, vorteilhafterweise in Kombination mit dem (den) erfindungsgemäßen Polynukleotid(en) (für die Zwecke der vorliegenden Anmeldung wird der Plural so ver-

standen, dass er den Singular mit umfasst, und umgekehrt). Gene des Fettsäure- oder Lipidmetabolismus, die verwendet werden, sind vorteilhafterweise aus der Gruppe ausgewählt, bestehend aus Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP [= Acylcarrierprotein] Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäureacyltransferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäuresynthase(n), Fettsäurehydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäuredesaturase(n), Fettsäureacetylenase(n), Lipoxygenase(n), Triacylglycerinlipase(n), Allenoxidsynthase(n), Hydroperoxidlyase(n) oder Fettsäureelongase(n). Gene die aus der Gruppe der $\Delta 4$ -Desaturasen, $\Delta 5$ -Desaturasen, $\Delta 6$ -Desaturasen, $\Delta 8$ -Desaturasen, $\Delta 9$ -Desaturasen, $\Delta 12$ -Desaturasen, $\Delta 15$ -Desaturasen, $\Delta 12$ - und $\Delta 15$ -Desaturasen, $\omega 3$ -Desaturase, $\Delta 6$ -Elongasen, $\Delta 9$ -Elongasen oder $\Delta 5$ -Elongasen ausgewählt sind, werden in Kombination mit dem erfindungsgemäßen Polynukleotid vorzugsweise verwendet, wobei es möglich ist, einzelne Gene oder eine Mehrzahl von Genen in Kombination zu verwenden. Hinsichtlich besonders bevorzugter Genkombinationen wird hier auf die Tabellen 5 und 6, die in den Beispielen dargestellt sind, verwiesen.

[0099] Vorteilhafterweise wandeln die Desaturasen, die bei dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden, ihre jeweiligen Substrate in die Form der CoA-Fettsäureester um. Wenn ein Elongationsschritt vorausgeht, führt dies vorteilhafterweise zu einer erhöhten Produktausbeute. Die jeweiligen Desaturierungsprodukte werden dadurch in größeren Mengen synthetisiert, weil der Elongationsschritt in der Regel mit dem CoA-Fettsäureester durchgeführt wird, wohingegen der Desaturierungsschritt hauptsächlich mit den Phospholipiden oder den Triglyceriden durchgeführt wird. Daher ist eine Substitutionsreaktion zwischen dem CoA-Fettsäureester und den Phospholipiden oder Triglyceriden, die eine weitere, möglicherweise beschränkende, Enzymreaktion erforderlich machen würde, nicht notwendig.

[0100] Aufgrund der enzymatischen Aktivität der Polypeptide, die bei dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden, kann bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ein breites Spektrum an mehrfach ungesättigten Fettsäuren produziert werden. Je nach der Auswahl der Organismen, wie der bevorzugten Pflanzen, die für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden, können Gemische der verschiedenen mehrfach ungesättigten Fettsäuren oder einzelne mehrfach ungesättigte Fettsäuren, wie EPA oder ARA, in freier oder gebundener Form produziert werden. Je nach der vorherrschenden Fettsäurezusammensetzung in der Ausgangspflanze (C18:2- oder C18:3-Fettsäuren) werden somit Fettsäuren, die von C18:2-Fettsäuren stammen, wie GLA, DGLA oder ARA, oder Fettsäuren, die von C18:3-Fettsäuren stammen, wie SDA, ETA oder EPA, erhalten. Wenn nur Linolsäure (= LA, C18:2 ^{$\Delta 9,12$}) als ungesättigte Fettsäure in der Pflanze, die für das Verfahren verwendet wird, vorhanden ist, kann das Verfahren nur GLA, DGLA und ARA als Produkte liefern, die sämtlich als freie Fettsäuren oder in gebundener Form vorhanden sein können. Wenn nur α -Linolensäure (= ALA, C18:3 ^{$\Delta 9,12,15$}) als ungesättigte Fettsäure in der Pflanze, die für das Verfahren verwendet wird, vorhanden ist, kann das Verfahren nur SDA, ETA, EPA und/oder DHA als Produkte liefern, die sämtlich als freie Fettsäuren oder in gebundener Form vorhanden sein können, wie vorstehend beschrieben. Aufgrund der Modifikation der Aktivität der Enzyme $\Delta 5$ -Desaturase, $\Delta 6$ -Desaturase, $\Delta 4$ -Desaturase, $\Delta 12$ -Desaturase, $\Delta 15$ -Desaturase, $\omega 3$ -Desaturase, $\Delta 5$ -Elongase und/oder $\Delta 6$ -Elongase, die bei der Synthese eine Rolle spielen, ist es möglich, auf gezielte Weise nur einzelne Produkte in den vorstehend genannten Organismen, vorteilhafterweise in den vorstehend genannten Pflanzen, zu produzieren. Aufgrund der Aktivität von $\Delta 6$ -Desaturase und $\Delta 6$ -Elongase werden zum Beispiel je nach der Ausgangspflanze und der ungesättigten Fettsäure GLA und DGLA oder SDA und ETA gebildet. DGLA oder ETA oder deren Gemische werden vorzugsweise gebildet. Wenn zusätzlich $\Delta 5$ -Desaturase, $\Delta 5$ -Elongase und $\Delta 4$ -Desaturase in die Organismen, vorteilhafterweise in die Pflanze, eingebracht werden, werden zusätzlich ARA, EPA und/oder DHA gebildet. Vorteilhafterweise werden je nach den Fettsäuren, die in dem Organismus oder in der Pflanze, der/die als Ausgangssubstanz für die Synthese wirkt, vorhanden sind, nur ARA, EPA oder DHA oder deren Gemische synthetisiert. Weil Biosynthesekaskaden beteiligt sind, sind die in Frage kommenden Endprodukte nicht als reine Substanzen in den Organismen vorhanden. Kleine Mengen der Vorstufenverbindungen sind immer zusätzlich in dem Endprodukt vorhanden. Diese kleinen Mengen machen weniger als 20 Gew.-%, vorteilhafterweise weniger als 15 Gew.-%, besonders vorteilhafterweise weniger als 10 Gew.-%, am vorteilhaftesten weniger als 5, 4, 3, 2 oder 1 Gew.-%, bezogen auf das Endprodukt DGLA, ETA oder ihre Gemische, oder ARA, EPA, DHA oder ihre Gemische, vorteilhafterweise EPA oder DHA oder ihre Gemische, aus.

[0101] Zusätzlich zu der Produktion der Ausgangsfettsäuren direkt im Organismus können für die Polypeptide, die bei dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden, die Fettsäuren auch von außen zugeführt werden. Die Produktion in dem Organismus ist aus Gründen der Wirtschaftlichkeit bevorzugt. Bevorzugte Substrate sind Linolsäure (C18:2 ^{$\Delta 9,12$}), γ -Linolensäure (C18:3 ^{$\Delta 6,9,12$}), Eicosadiensäure (C20:2 ^{$\Delta 11,14$}), Dihomo- γ -linolensäure (C20:3 ^{$\Delta 8,11,14$}), Arachidonsäure (C20:4 ^{$\Delta 5,8,11,14$}), Docosatetraensäure (C22:4 ^{$\Delta 7,10,13,16$}) und Docosapentaensäure (C22:5 ^{$\Delta 4,7,10,13,15$}).

[0102] Um die Ausbeute bei dem beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Ölen und/oder Triglyceriden mit einem vorteilhafterweise erhöhten Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren zu erhöhen, ist es vorteilhaft, die Menge an Ausgangsprodukt für die Synthese von Fettsäuren zu erhöhen; dies kann zum Beispiel erreicht werden, indem man in den Organismus eine Nukleinsäure einbringt, die ein Polypeptid mit einer erfindungsgemäßen $\Delta 12$ -Desaturase- und/oder (15-Desaturase-Aktivität kodiert. Dies ist besonders vorteilhaft in ölproduzierenden Organismen, wie solchen aus der Familie der Brassicaceae, wie der Gattung *Brassica*, zum Beispiel Raps; der Familie der Elaeagnaceae, wie der Gattung *Elaeagnus*, zum Beispiel der Gattung und Spezies *Olea europaea*, oder der Familie Fabaceae, wie der Gattung *Glycine*, zum Beispiel der Gattung und Spezies *Glycine max*, die reich an Ölsäure sind. Weil diese Organismen nur wenig Linolsäure enthalten (Mikoklajczak et al., Journal of the American Oil Chemical Society, 38, 1961, 678–681), ist die Verwendung der vorstehend genannten erfindungsgemäßen $\Delta 12$ -Desaturasen und/oder (15-Desaturasen zur Produktion des Ausgangsmaterials Linolsäure vorteilhaft.

[0103] Das erfindungsgemäße Verfahren setzt vorteilhafterweise die vorstehend genannten Nukleinsäuresequenzen oder ihre Derivate oder Homologe ein, die für Polypeptide kodieren, die die enzymatische Aktivität der Proteine, die von den Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, beibehalten. Diese Sequenzen werden einzeln oder in Kombination mit den erfindungsgemäßen Polynukleotiden in Expressionskonstrukte kloniert und für das Einbringen und die Expression in Organismen verwendet. Aufgrund ihrer Konstruktion ermöglichen diese Expressionskonstrukte eine vorteilhafte optimale Synthese der mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die bei dem erfindungsgemäßen Verfahren produziert werden.

[0104] In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Verfahren außerdem den Schritt, in dem man eine Zelle oder einen intakten Organismus erhält, die/der die bei dem Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen umfasst, wobei die Zelle und/oder der Organismus mit einem erfindungsgemäßen Polynukleotid, einem Genkonstrukt oder einen Vektor, wie nachstehend beschrieben, allein oder in Kombination mit weiteren Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine des Fettsäure- oder Lipidmetabolismus kodieren, transformiert wird. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst dieses Verfahren außerdem den Schritt, in dem man die Öle, Lipide oder freien Fettsäuren aus dem Organismus oder aus der Kultur erhält. Die Kultur kann zum Beispiel die Form einer Fermentationskultur annehmen, zum Beispiel im Fall der Züchtung von Mikroorganismen, wie zum Beispiel *Mortierella*, *Thalassiosira*, *Mantoniella*, *Ostreococcus*, *Saccharomyces* oder *Thraustochytrium*, oder einer in Gewächshaus oder auf dem Feld gezüchteten Kultur einer Pflanze. Die Zelle oder der Organismus, die so produziert werden, ist vorteilhafterweise eine Zelle eines ölproduzierenden Organismus, wie einer Ölpflanze, wie zum Beispiel Erdnuss, Raps, Canola, Leinsamen, Hanf, Sojabohne, Färberdistel, Sonnenblumen oder Borretsch.

[0105] Im Fall von Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenorganen wird "Züchten" so verstanden, dass es zum Beispiel die Züchtung auf oder in einem Nährmedium oder der intakten Pflanze auf oder in einem Substrat, zum Beispiel in einer Hydroponiekultur, auf Blumenerde oder auf urbarem Land bedeutet.

[0106] Geeignete Organismen oder Wirtszellen für die erfindungsgemäßen Verfahren sind solche, die in der Lage sind, Fettsäuren, spezifisch ungesättigte Fettsäuren, zu synthetisieren und/oder die für die Expression rekombinanter Gene geeignet sind. Beispiele, die erwähnt werden können, sind Pflanzen, wie *Arabidopsis*, *Asteraceae*, wie *Calendula*, oder Erntepflanzen, wie Sojabohne, Erdnuss, Rizinusölpflanze, Sonnenblume, Mais, Baumwolle, Flachs, Raps, Kokosnuss, Ölpalme, Färberdistel (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne, Mikroorganismen, wie Pilze, zum Beispiel 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 *Cryptocodium*. Bevorzugte Organismen sind solche, die natürlicherweise in der Lage sind, erhebliche Mengen Öl zu synthetisieren, wie Pilze, wie *Mortierella alpina*, *Pythium insidiosum*, *Phytophthora infestans*, oder Pflanzen, wie Sojabohne, Raps, Kokosnuss, Ölpalme, Färberdistel, Flachs, Hanf, Rizinusölpflanze, *Calendula*, Erdnuss, Kakaobohne oder Sonnenblume, oder Hefen, wie *Saccharomyces cerevisiae*, wobei Sojabohne, Flachs, Raps, Färberdistel, Sonnenblume, *Calendula*, *Mortierella* oder *Saccharomyces cerevisiae* besonders bevorzugt sind. Zusätzlich zu den vorstehend genannten transgenen Organismen sind im Prinzip als Wirtsorganismen auch transgene Tiere, vorteilhafterweise nicht-menschliche Tiere, zum Beispiel *Caenorhabditis elegans*, geeignet. Weitere geeignete Wirtszellen und Organismen sind bereits vorstehend umfassend beschrieben.

[0107] Transgene Pflanzen, die die mehrfach ungesättigten Fettsäuren umfassen, die bei dem erfindungsgemäßen Verfahren synthetisiert werden, können vorteilhafterweise direkt vermarktet werden, ohne dass die Notwendigkeit besteht, dass die synthetisierten Öle, Lipide oder Fettsäuren isoliert werden. Pflanzen für die

erfindungsgemäßen Verfahren sind so aufgeführt, das sie intakte Pflanzen und sämtliche Pflanzenteile, Pflanzenorgane oder Pflanzenteile, wie Blatt, Stamm, Samen, Wurzel, Knollen, Antheren, Fasern, Wurzelhaare, Stengel, Embryonen, Calli, Kotyledonen, Petiolen, geerntetes Material, Pflanzengewebe, Reproduktionsgewebe und Zellkulturen bedeuten, die aus der transgenen Pflanze stammen und/oder zur Herstellung der transgenen Pflanze verwendet werden können. In diesem Zusammenhang umfasst Samen alle Teile der Samen, wie die Samenhüllen, epidermale Zellen, Samenzellen, Endosperm- oder Embryogewebe. Die bei dem erfindungsgemäßen Verfahren produzierten Verbindungen können jedoch auch aus den Organismen, vorteilhafterweise Pflanzen, in Form ihrer Öle, Fette, Lipide und/oder freien Fettsäuren isoliert werden. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren, die durch dieses Verfahren produziert werden, können durch Ernten der Organismen, entweder aus der Feldfrucht, in der sie wachsen, oder von dem Feld erhalten werden. Dies kann durch Pressen oder Extraktion der Pflanzenteile, vorzugsweise der Pflanzesamen, durchgeführt werden. In diesem Zusammenhang können die Öle, Fette, Lipide und/oder freien Fettsäuren durch Pressen mithilfe des so genannten Kaltschlagens oder Kaltpressens ohne Anwendung von Wärme erhalten werden. Damit die Pflanzenteile, genauer gesagt die Samen, leichter aufgebrochen werden können, werden sie zuvor zerrieben, gedämpft oder geröstet. Die auf diese Weise vorbehandelten Samen können anschließend gepresst oder mit Lösungsmittel, wie warmer Hexan, extrahiert werden. Das Lösungsmittel wird anschließend entfernt. Im Fall von Mikroorganismen werden die letzteren nach dem Ernten zum Beispiel direkt ohne weitere Verarbeitungsschritte extrahiert oder auch nach dem Aufbrechen über verschiedene Verfahren, mit denen der Fachmann vertraut ist, extrahiert. Auf diese Weise können mehr als 96% der bei dem Verfahren produzierten Verbindungen isoliert werden. Danach werden die erhaltenen Produkte weiter verarbeitet, d. h. raffiniert. Bei diesem Verfahren werden zum Beispiel zuerst die Pflanzenschleimstoffe und suspendierte Substanz entfernt. Das so genannte Entschleimen kann enzymatisch oder zum Beispiel chemisch-physikalisch durch Zugabe von Säure, wie Phosphorsäure, bewirkt werden. Danach werden die freien Fettsäuren durch Behandlung mit einer Base, zum Beispiel Natriumhydroxid-Lösung, entfernt. Das erhaltene Produkt wird gründlich mit Wasser gewaschen, um das im Produkt verbleibende Alkali zu entfernen, und dann getrocknet. Um die im Produkt verbleibenden Pigmente zu entfernen, werden die Produkte Bleichen, zum Beispiel unter Verwendung von Fullererde oder Aktivkohle, unterzogen. Schließlich wird das Produkt, zum Beispiel unter Verwendung von Dampf, desodoriert.

[0108] Die durch dieses Verfahren produzierten PUFAs oder LCPUFAs sind vorzugsweise C₁₈-, C₂₀- oder C₂₂-Fettsäuremoleküle, vorteilhafterweise C₂₀- oder C₂₂-Fettsäuremoleküle, mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen. Diese C₁₈-, C₂₀- oder C₂₂-Fettsäuremoleküle können aus dem Organismus in Form eines Öl, eines Lipids oder einer freien Fettsäure isoliert werden. Geeignete Organismen sind zum Beispiel die vorstehend genannten. Bevorzugte Organismen sind transgene Pflanzen.

[0109] Eine Ausführungsform der Erfindung sind daher Öle, Lipide oder Fettsäuren oder Fraktionen davon, die durch das vorstehend beschriebene Verfahren produziert worden sind, besonders bevorzugt Öl, Lipid oder eine Fettsäurezusammensetzung, das/die PUFAs umfasst und aus transgenen Pflanzen stammt.

[0110] Diese Öle, Lipide oder Fettsäurezusammensetzungen umfassen vorzugsweise die vorstehend genannten Fettsäuren, besonders bevorzugt in der vorstehend genannten Konzentration. In einer Ausführungsform der Erfindung sind die Öle, Lipide oder Fettsäurezusammensetzungen, die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhalten werden, durch die Tatsache erkennbar, dass die Zubereitungen, die diese Öle, Lipide oder Fettsäurezusammensetzungen umfassen, Spuren der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren enthalten. Diese Spuren können mittels geeigneter hoch-sensitiver Nachweisverfahren, zum Beispiel Technologien auf PCR-Basis, nachgewiesen werden.

[0111] Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist die Verwendung des Öls, des Lipids, der Fettsäuren und/oder der Fettsäurezusammensetzung in Futtermitteln, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika. Die erfindungsgemäßen Öle, Lipide, Fettsäuren oder Fettsäuregemische können auf die Weise, mit der der Fachmann vertraut ist, zum Mischen mit anderen Ölen, Lipiden, Fettsäuren oder Fettsäuregemischen tierischen Ursprungs, wie zum Beispiel Fischölen, verwendet werden. Diese Öle, Lipide, Fettsäuren oder Fettsäuregemische, die aus pflanzlichen und tierischen Bestandteilen bestehen, können auch zur Herstellung von Futtermitteln, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika verwendet werden.

[0112] Der Begriff "Öl", "Lipid" oder "Fett" wird so verstanden, dass er ein Fettsäuregemisch bedeutet, das ungesättigte, gesättigte, vorzugsweise veresterte, Fettsäure(n) umfasst. Das Öl, Lipid oder Fett ist vorzugsweise reich an mehrfach ungesättigte(r/n) freie(r/n) oder vorteilhafterweise veresterte(r/n) Fettsäure(n), insbesondere den vorstehend erwähnten. Die Menge an ungesättigten veresterten Fettsäuren macht vorzugsweise bis zu etwa 30% aus, ein Gehalt von 50% ist stärker bevorzugt, ein Gehalt von 60%, 70%, 80% oder mehr ist

noch stärker bevorzugt. Für die Analyse kann der Fettsäuregehalt zum Beispiel mittels Gaschromatographie bestimmt werden, nachdem die Fettsäuren mittels Umesterung in die Methylester umgewandelt wurden. Das Öl, Lipid oder Fett kann verschiedene andere gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren umfassen, zum Beispiel Calendulinsäure, Palmitinsäure, Palmitoleinsäure, Stearinsäure, Ölsäure und dergleichen. Der Gehalt der verschiedenen Fettsäuren in dem Öl oder Fett kann, insbesondere je nach dem Ausgangsorganismus, variieren.

[0113] Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit vorteilhafterweise mindestens zwei Doppelbindungen, die bei dem Verfahren produziert werden, sind, wie vorstehend beschrieben, zum Beispiel Sphingolipide, Phosphoglyceride, Lipide, Glykolipide, Phospholipide, Monoacylglycerin, Diacylglycerin, Triacylglycerin oder andere Fettsäureester.

[0114] Ausgehend von den mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit vorteilhafterweise mindestens fünf oder sechs Doppelbindungen, wobei diese Säuren bei dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt worden sind, können die vorhandenen mehrfach ungesättigten Fettsäuren zum Beispiel durch Behandlung mit Alkali, zum Beispiel wässrigem KOH oder NaOH, oder durch Säurehydrolyse, vorteilhafterweise in Anwesenheit eines Alkohols, wie Methanol oder Ethanol, oder über enzymatische Spaltung freigesetzt werden und zum Beispiel durch Phasentrennung und anschließende Ansäuerung, zum Beispiel mit H_2SO_4 , isoliert werden. Die Fettsäuren können auch direkt ohne den vorstehend beschriebenen Arbeitsschritt freigesetzt werden.

[0115] Nachdem sie in einen Organismus, vorteilhafterweise eine Pflanzenzelle oder Pflanze, eingebracht worden sind, können die bei dem Verfahren verwendeten Nukleinsäuren entweder auf einem separaten Plasmid oder vorteilhafterweise integriert in das Genom der Wirtszelle vorliegen. Im Fall einer Integration in das Genom kann die Integration zufallsgemäß sein oder auch mittels Rekombination, so dass das native Gen durch die eingebrachte Kopie ersetzt wird, wodurch die Produktion der gewünschten Verbindung durch die Zelle moduliert wird, oder durch Verwendung eines Gens in "trans" hervorgerufen werden, so dass das Gen funktionsfähig mit einer funktionellen Expressionseinheit verknüpft wird, die mindestens eine Sequenz, die die Expression eines Gens sicherstellt, und mindestens eine Sequenz, die die Polyadenylierung eines funktionell transkribierten Gens gewährleistet, umfasst. Die Nukleinsäuren werden in die Organismen vorteilhafterweise über Mehrfach-Expressions-kassetten oder Konstrukte für die multiparallele Expression, in die Pflanzen vorteilhafterweise für die multiparallele samenspezifischen Expression von Genen, eingebracht.

[0116] Moose und Algen sind die einzigen bekannten Pflanzensysteme, die erhebliche Mengen an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wie Arachidonsäure (ARA) und/oder Eicosapentaensäure (EPA) und/oder Docosahexaensäure (DHA), produzieren. Moose umfassen PUFAs in Membranlipiden, wohingegen Algen, Organismen, die mit Algen verwandt sind, und einige wenige Pilze auch erhebliche Mengen an PUFAs in der Triacylglycerin-Fraktion akkumulieren. Aus diesem Grund sind Nukleinsäuremoleküle, die aus solchen Stämmen isoliert werden, die PUFAs auch in der Triacylglycerin-Fraktion akkumulieren, besonders vorteilhaft für die erfindungsgemäßen Verfahren und somit für die Modifikation des Lipid- und PUFA-Produktionssystems in einem Wirt, insbesondere in Pflanzen, wie Ölpflanzen, zum Beispiel Raps, Canola, Leinsamen, Hanf, Sojabohnen, Sonnenblumen und Borago. Sie können daher bei dem erfindungsgemäßen Verfahren vorteilhaft verwendet werden.

[0117] Substrate aus dem Fettsäure- oder Lipidmetabolismus, die für die erfindungsgemäßen Polypeptide, die aus der Gruppe der Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP-[= Acylcarrierprotein-]Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäureacyltransferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäuresynthase(n), Fettsäurehydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäuresaturase(n), Fettsäureacetylenase(n), Lipoxygenase(n), Triacylglycerinlipase(n), Allenoxidsynthase(n), Hydroperoxidlyase(n) oder Fettsäureelongase(n) ausgewählt sind, geeignet sind, sind vorzugsweise C_{16} -, C_{18} - oder C_{20} -Fettsäuren. Die Fettsäuren, die als Substrate bei dem Verfahren umgewandelt werden, werden vorzugsweise in die Form ihrer Acyl-CoA-Ester und/oder ihrer Phospholipidester umgewandelt.

[0118] Zur Herstellung der erfindungsgemäßen langkettigen PUFAs müssen die mehrfach ungesättigten C_{18} -Fettsäuren zuerst durch die enzymatische Aktivität einer Desaturase desaturiert und anschließend durch eine Elongase um mindestens zwei Kohlenstoffatome verlängert werden. Nach einem Elongationszyklus liefert diese Enzymaktivität C_{20} -Fettsäuren und nach zwei Elongationszyklen C_{22} -Fettsäuren. Die Aktivität der Desaturasen und Elongasen, die bei den erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden, führt vorzugsweise zu C_{18} -, C_{20} - und/oder C_{22} -Fettsäuren, vorteilhafterweise mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise mit drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen, besonders bevorzugt zu C_{20} - und/oder C_{22} -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. Nach-

dem eine erste Desaturierung und die Elongation stattgefunden haben, können weitere Desaturierungs- und Elongationsschritte, wie zum Beispiel eine solche Desaturierung an den Positionen $\Delta 5$ und $\Delta 4$, erfolgen. Produkte des erfindungsgemäßen Verfahrens, die besonders bevorzugt sind, sind Dihomo- γ -linolensäure, Arachidonsäure, Eicosapentaensäure, Docosapentaensäure und/oder Docosahexaensäure. Die C_{20} -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, desaturiert werden.

[0119] Der bevorzugte Ort der Biosynthese von Fettsäuren, Ölen, Lipiden oder Fetten in den Pflanzen, die vorteilhafterweise verwendet werden, ist zum Beispiel im Allgemeinen der Samen oder Zellschichten des Samens, so dass eine samenspezifische Expression der bei dem Verfahren verwendeten Nukleinsäuren erkennbar ist. Es ist jedoch offensichtlich, dass die Biosynthese von Fettsäuren, Ölen oder Lipiden nicht auf die Samengewebe beschränkt sein muss, sondern auch in gewebespezifischer Weise in allen anderen Teilen der Pflanze – zum Beispiel in epidermalen Zellen oder in den Knollen – erfolgen kann.

[0120] Wenn ein Mikroorganismus, wie Hefen, wie *Saccharomyces* oder *Schizosaccharomyces*, Pilze, wie *Mortierella*, *Aspergillus*, *Phytophthora*, *Entomophthora*, *Mucor* oder *Thraustochytrium*, Algen, wie *Isochrysis*, *Mantoniella*, *Ostreococcus*, *Phaeodactylum* oder *Cryptocodinium*, als Organismen bei dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden, werden diese Organismen vorteilhafterweise in Fermentationskulturen gezüchtet.

[0121] Aufgrund der Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, die für eine Desaturase kodieren, können die bei dem Verfahren produzierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren um mindestens 5%, vorzugsweise um mindestens 10%, besonders bevorzugt um mindestens 20%, ganz besonders bevorzugt um mindestens 50% im Vergleich zu dem Wildtyp der Organismen, die nicht die Nukleinsäuren rekombinant umfassen, gesteigert werden.

[0122] Im Prinzip können die mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die durch das erfindungsgemäße Verfahren produziert werden, in den Organismen, die bei dem Verfahren verwendet werden, auf zwei verschiedene Weisen gesteigert werden. Vorteilhafterweise kann der Pool an freien mehrfach ungesättigten Fettsäuren und/oder der Gehalt der veresterten mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die durch das Verfahren produziert werden, vergrößert werden. Vorteilhafterweise wird der Pool an veresterten mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den transgenen Organismen durch das erfindungsgemäße Verfahren vergrößert.

[0123] Wenn Mikroorganismen als Organismen bei dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden, werden sie je nach dem Wirtsorganismus auf eine Weise gezüchtet oder kultiviert, mit der der Fachmann vertraut ist. In der Regel werden Mikroorganismen in einem flüssigen Medium, das eine Kohlenstoffquelle, in der Regel in Form von Zuckern, eine Stickstoffquelle, in der Regel in Form von organischen Stickstoffquellen, wie Hefeextrakt oder Salzen, wie Ammoniumsulfat, Spurenelemente, wie Salze von Eisen, Mangan und Magnesium, und, wenn geeignet, Vitamine umfasst, bei Temperaturen zwischen 0°C und 100°C, vorzugsweise zwischen 10°C und 60°C, unter Einleiten von Sauerstoffgas gezüchtet. Der pH der Nährlösung kann entweder konstant gehalten, d. h. während des Kultivierungszeitraums reguliert, werden oder nicht. Die Kulturen können chargenweise, semi-chargenweise oder kontinuierlich gezüchtet werden. Nährstoffe können zu Beginn der Fermentation bereitgestellt oder semi-kontinuierlich oder kontinuierlich zugeführt werden. Die produzierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren können aus den Organismen, wie vorstehend beschrieben, durch Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind, zum Beispiel durch Extraktion, Destillation, Kristallisation, wenn anwendbar, Ausfällung mit Salz, und/oder Chromatographie, isoliert werden. Zu diesem Zweck können die Organismen vorteilhafterweise zuvor aufgebrochen werden.

[0124] Wenn die Wirtsorganismen Mikroorganismen sind, wird das erfindungsgemäße Verfahren vorteilhafterweise bei einer Temperatur zwischen 0°C und 95°C, vorzugsweise zwischen 10°C und 85°C, besonders bevorzugt zwischen 15°C und 75°C, ganz besonders bevorzugt zwischen 15°C und 45°C durchgeführt.

[0125] Bei diesen Verfahren wird der pH-Wert vorteilhafterweise zwischen pH 4 und 12, vorzugsweise zwischen pH 6 und 9, besonders bevorzugt zwischen pH 7 und 8 gehalten.

[0126] Das erfindungsgemäße Verfahren kann chargenweise, semi-chargenweise oder kontinuierlich betrieben werden. Ein Überblick über bekannte Kultivierungsverfahren lässt sich in dem Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik [Bioprocess technology 1. Introduction to bioprocess technology] (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder in dem Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und

periphere Einrichtungen [Bioreactors und peripheral equipment] (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) finden.

[0127] Das Kulturmedium, das verwendet werden soll, muss geeigneterweise die Anforderungen der in Frage kommenden Stämme erfüllen. Beschreibungen von Kulturmedien für verschiedene Mikroorganismen können in dem Lehrbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D. C., USA, 1981) gefunden werden.

[0128] Wie vorstehend beschrieben, umfassen diese Medien, die erfindungsgemäß eingesetzt werden können, in der Regel eine oder mehrere Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen, anorganische Salze, Vitamine und/oder Spurenelemente.

[0129] Bevorzugte Kohlenstoffquellen sind Zucker, wie Mono-, Di- oder Polysaccharide. Beispiele für sehr gute Kohlenstoffquellen sind Glucose, Fructose, Mannose, Galactose, Ribose, Sorbose, Ribulose, Lactose, Maltose, Saccharose, Raffinose, Stärke oder Cellulose. Zucker können zu den Medien auch über komplexe Verbindungen, wie Melassen oder andere Nebenprodukte der Zuckerraffination, zugegeben werden. Die Zugabe von Gemischen aus einer Vielzahl von Kohlenstoffquellen kann ebenfalls vorteilhaft sein. Andere mögliche Kohlenstoffquellen sind Öle und Fette, wie zum Beispiel Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und/oder Kokosnussfett, Fettsäuren, wie zum Beispiel Palmitinsäure, Stearinsäure und/oder Linolsäure, Alkohole und/oder Polyalkohole, wie zum Beispiel Glycerin, Methanol und/oder Ethanol, und/oder organische Säuren, wie zum Beispiel Essigsäure und/oder Milchsäure.

[0130] Stickstoffquellen sind in der Regel organische oder anorganische Stickstoffverbindungen oder Substanzen, die diese Verbindungen umfassen. Beispiele für Stickstoffquellen umfassen Ammoniak in flüssiger oder Gasform oder Ammoniumsalze, wie 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 Gemisch verwendet werden.

[0131] Anorganische Salzverbindungen, die in den Medien vorliegen können, umfassen die Chlorid-, Phosphor- und Sulfatsalze von Calcium, Magnesium, Natrium, Kobalt, Molybdän, Kalium, Mangan, Zink, Kupfer und Eisen.

[0132] Anorganische schwefelhaltige Verbindungen, wie zum Beispiel Sulfate, Sulfite, Dithionite, Tetrathionate, Thiosulfate, Sulfide, oder auch organische Schwefelverbindungen, wie Mercaptane und Thiole, können als Quellen für Schwefel zur Herstellung von schwefelhaltigen Feinchemikalien, insbesondere von Methionin, verwendet werden.

[0133] Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden natriumhaltigen Salze können als Quellen von Phosphor verwendet werden.

[0134] Chelatisierungsmittel können zum Medium zugegeben werden, um die Metallionen in Lösung zu halten. Besonders geeignete Chelatisierungsmittel umfassen Dihydroxyphenole, wie Catechol oder Protocatechuat, und organische Säuren, wie Citronensäure.

[0135] Die Fermentationsmedien, die erfindungsgemäß zur Kultivierung von Mikroorganismen verwendet werden, umfassen in der Regel auch andere Wachstumsfaktoren, wie Vitamine oder Wachstumsförderer, zu denen zum Beispiel Biotin, Riboflavin, Thiamin, Folsäure, Nicotinsäure, Pantothenat und Pyridoxin gehören. Wachstumsfaktoren und Salze stammen häufig aus komplexen Medienkomponenten, wie Hefeextrakt, Melassen, Maisquellwasser und dergleichen. Es ist außerdem möglich, geeignete Vorstufen zum Kulturmedium hinzuzufügen. Die genaue Zusammensetzung der Medienverbindungen hängt stark von dem besonderen Experiment ab und wird individuell für jeden spezifischen Fall entschieden. Informationen zur Optimierung von Medien lassen sich in dem Lehrbuch "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach" (Herausgeber P. M. Rhodes, P. F. Stanbury, IRL Press (1997) S. 53–73, ISBN 0 19 963577 3) finden. Wachstumsmedien können auch von kommerziellen Zulieferern erhalten werden, zum Beispiel Standard 1 (Merck) oder BHI (Hirn Herz-Infusion, DIFCO) und dergleichen.

[0136] All Medienkomponenten werden entweder durch Hitze (20 min bei 1,5 bar und 121°C) oder durch Filtersterilisierung sterilisiert. Die Komponenten können entweder zusammen oder, wenn erforderlich, getrennt

sterilisiert werden. Sämtliche Medienkomponenten können zu Beginn der Züchtung vorliegen oder kontinuierlich oder chargenweise, wie gewünscht, zugegeben werden.

[0137] Die Kulturtemperatur liegt normalerweise zwischen 15°C und 45°C, vorzugsweise bei 25°C bis 40°C, und kann während des Experiments konstant gehalten oder verändert werden. Der pH des Mediums sollte in dem Bereich von 5 bis 8,5, vorzugsweise bei etwa 7,0 liegen. Der pH für die Kultivierung kann während der Kultivierung durch Zugabe basischer Verbindungen, wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak und wässrigem Ammoniak, oder saurer Verbindungen, wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure, reguliert werden. Das Schäumen kann durch Einsetzen von Antischaummitteln, wie zum Beispiel Fettsäurepolyglykolester, reguliert werden. Um die Stabilität von Plasmiden aufrechtzuerhalten, ist es möglich, zum Medium geeignete Substanzen mit einer Selektionswirkung, zum Beispiel Antibiotika, zuzugeben. Aerobe Bedingungen werden durch Einbringen von Sauerstoff oder sauerstoffhaltiger Gasgemische, wie zum Beispiel Umgebungsluft, in die Kultur aufrechterhalten. Die Temperatur der Kultur beträgt normalerweise 20°C bis 45°C und vorzugsweise 25°C bis 40°C. Die Kultur wird fortgesetzt, bis die Bildung des gewünschten Produkts ein Maximum erreicht hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

[0138] Die auf diese Weise erhaltenen Fermentationsbrühen, insbesondere solche, die mehrfach ungesättigte Fettsäuren enthalten, enthalten in der Regel eine Trockenmasse von 7,5 bis 25 Gew.-%.

[0139] Die Fermentationsbrühe kann dann weiter verarbeitet werden. Die Biomasse kann, wie erforderlich, vollständig oder teilweise aus der Fermentationsbrühe durch Abtrennungsverfahren, wie zum Beispiel Zentrifugation, Filtration, Dekantieren oder eine Kombination dieser Verfahren, entfernt werden oder vollständig in der Brühe belassen werden. Es ist vorteilhaft, wenn die Biomasse nach ihrer Abtrennung verarbeitet wird.

[0140] Die Fermentationsbrühe kann jedoch auch ohne Abtrennen der Zellen unter Verwendung bekannter Verfahren, wie zum Beispiel mithilfe eines Rotationsverdampfers, Dünnschichtverdampfers, Fallfilmverdampfers, durch reverse Osmose oder durch Nanofiltration, eingedickt oder eingeeengt werden. Schließlich kann diese konzentrierte Fermentationsbrühe verarbeitet werden, so dass die darin vorhandenen Fettsäuren erhalten werden.

[0141] Die erfindungsgemäßen Polynukleotide oder Polypeptide, die am Stoffwechsel von Lipiden und Fettsäuren, PUFA-Cofaktoren und Enzymen oder am Transport von lipophilen Verbindungen über Membranen beteiligt sind, werden bei dem erfindungsgemäßen Verfahren für die Modulation der Produktion von PUFAs in transgenen Organismen, vorteilhafterweise in Pflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Sojabohne, Erdnuss, Baumwolle, Linum-Spezies, wie Leinsamen oder Flachs, Brassica-Spezies, wie Raps, Canola und Rübsen, Pfeffer, Sonnenblume, Borretsch, Nachtkerze und Tagetes, Solanaceae-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Spezies, Erbse, Cassava, Alfalfa, buschigen Pflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Spezies, Bäumen (Ölpalme, Kokosnuss) und ausdauernden Gräsern und Futterpflanzen, entweder direkt verwendet (zum Beispiel, wenn die Überexpression oder Optimierung eines Fettsäure-Biosyntheseproteins eine direkte Wirkung auf die Ausbeute, Produktion und/oder Produktionseffizienz der Fettsäure aus modifizierten Organismen hat) und/oder kann eine indirekte Wirkung besitzen, die trotzdem zu einer erhöhten Ausbeute, Produktion und/oder Produktionseffizienz der PUFAs oder zu einer Verringerung von ungewünschten Verbindungen führt (zum Beispiel, wenn die Modulation des Stoffwechsels von Lipiden und Fettsäuren, Cofaktoren und Enzymen zu Modifikationen der Ausbeute, Produktion und/oder Produktionseffizienz oder der Zusammensetzung der gewünschten Verbindungen in den Zellen führt, was wiederum die Produktion von einer oder mehreren Fettsäuren beeinflussen kann).

[0142] Die Kombination verschiedener Vorstufenmoleküle und Biosynthese-Enzyme führt zur Produktion verschiedener Fettsäuremoleküle, was eine maßgebliche Wirkung auf die Lipidzusammensetzung hat, weil mehrfach ungesättigte Fettsäuren (= PUFAs) nicht nur leicht in Triacylglycerin, sondern auch in Membranlipide eingebaut werden.

[0143] Brassicaceae, Boraginaceae, Primulaceae oder Linaceae sind besonders zur Herstellung von PUFAs, zum Beispiel Stearidonsäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure, geeignet. Leinsamen (*Linum usitatissimum*) ist, wie beschrieben, vorteilhafterweise in Kombination mit weiteren Desaturasen und Elongasen, besonders vorteilhaft zur Herstellung von PUFAs mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen geeignet.

[0144] Die Lipidsynthese lässt sich in zwei Abschnitte unterteilen: die Synthese von Fettsäuren und ihre Bindung an sn-Glycerin-3-phosphate und die Anfügung oder Modifikation einer polaren Kopfgruppe. Übliche Li-

pide, 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 zwei Produktmoleküle zusammen Acetoacetyl-ACP, das über eine Reihe von Kondensations-, Reduktions- und Dehydratationsreaktionen 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, entweder aerob durch molekularen Sauerstoff oder anaerob, katalysiert (hinsichtlich der Fettsäuresynthese in Mikroorganismen siehe F. C. Neidhardt et al. (1996) *E. coli* und *Salmonella*. ASM Press: Washington, D. C., S. 612–636 und die darin genannten Literaturstellen; Lengeler et al. (Hrsg.) (1999) *Biology of Prokaryotes*. Thieme: Stuttgart, New York und die Literaturstellen darin sowie Magnuson, K., et al. (1993) *Microbiological Reviews* 57: 522–542 und die Literaturstellen darin). Damit sie weiteren Elongationsschritten unterzogen werden können, müssen die erhaltenen Phospholipidgebundenen Fettsäuren zum Fettsäure-CoA-Ester-Pool aus den Phospholipiden zurückgeschleust werden. Für die weitere Desaturierung, wie vorstehend beschrieben, kann die Fettsäure zurück in den Phospholipid-Pool überführt werden. Wenn angebracht, kann diese Reaktionsabfolge wiederholt durchlaufen werden.

[0145] Beispiele für Vorstufen für die Biosynthese von PUFAs sind Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure. Diese C_{18} -Kohlenstoffatome-Fettsäuren müssen auf C_{20} und C_{22} - verlängert werden, damit Fettsäuren des Eicosa- und Docosa-Kettentyps erhalten werden. Mithilfe der Desaturasen, die bei dem Verfahren verwendet werden, wie der $\Delta 12$ -, $\Delta 15$ -, $\Delta 12$ - und $\Delta 15$ -, $\omega 3$ -, $\Delta 4$ -, $\Delta 5$ - und $\Delta 6$ -Desaturasen, und/oder der $\Delta 5$ -, $\Delta 6$ -Elongasen können Arachidonsäure, Eicosapentaensäure, Docosapentaensäure oder Docosahexaensäure, vorteilhafterweise Eicosapentaensäure und/oder Docosahexaensäure, produziert und anschließend bei verschiedenen Anwendungen im Hinblick auf Nahrungsmittel, Futtermittel, Kosmetika oder Pharmazeutika eingesetzt werden. C_{20} - und/oder C_{22} -Fettsäuren mit mindestens zwei, vorteilhafterweise mindestens drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise C_{20} - oder C_{22} -Fettsäuren mit vorteilhafterweise vier, fünf oder sechs Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, können unter Verwendung der vorstehend genannten Enzyme hergestellt werden. Die Desaturierung kann vor oder nach der Elongation der in Frage kommenden Fettsäure stattfinden. Aus diesem Grund führen die Produkte der Desaturase-Aktivitäten und der weiteren Desaturierungs- und Elongationsschritte, die möglich sind, zu bevorzugten PUFAs mit einem höheren Grad an Desaturierung, einschließlich einer weiteren Elongation von C_{20} - bis C_{22} -Fettsäuren, zu Fettsäuren, wie γ -Linolensäure, Dihomo- γ -linolensäure, Arachidonsäure, Stearidonsäure, Eicosatetraensäure oder Eicosapentaensäure. Substrate der Desaturasen und Elongasen, die bei dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden, sind C_{16} -, C_{18} - oder C_{20} -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 oder Arachidonsäure, Eicosatetraensäure oder Eicosapentaensäure. Die synthetisierten C_{20} - oder C_{22} -Fettsäuren mit mindestens zwei, drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen in der Fettsäure werden bei dem erfindungsgemäßen Verfahren in Form der freien Fettsäure oder in Form ihrer Ester, zum Beispiel in Form ihrer Glyceride, erhalten.

[0146] Der Begriff "Glycerid" wird so verstanden, dass er ein Glycerin bedeutet, das mit einem, zwei oder drei Carboxylresten verestert ist (Mono-, Di- oder Triglycerid). "Glycerid" wird auch so verstanden, dass ein Gemisch verschiedener Glyceride gemeint ist. Das Glycerid oder Glyceridgemisch kann weitere Zugaben umfassen, zum Beispiel freie Fettsäuren, Antioxidantien, Proteine, Kohlenhydrate, Vitamine und/oder andere Substanzen.

[0147] Für die Zwecke des erfindungsgemäßen Verfahrens wird ein "Glycerid" außerdem so verstanden, dass es Glycerinderivate bedeutet. Zusätzlich zu den vorstehend beschriebenen Fettsäureglyceriden beinhalten diese auch Glycerophospholipide und Glyceroglycolipide. Bevorzugte Beispiele, die in diesem Zusammenhang erwähnt werden können, sind die Glycerophospholipide, wie Lecithin (Phosphatidylcholin), Cardiolipin, Phosphatidylglycerin, Phosphatidylserin und Alkylacylglycerophospholipide.

[0148] Außerdem müssen Fettsäuren anschließend zu verschiedenen Modifikationsstellen überführt werden und in das Triacylglycerin-Speicherlipid eingebaut werden. Ein weiterer wichtiger Schritt bei der Lipidsynthese ist der Transfer von Fettsäuren zu den polaren Kopfgruppen, zum Beispiel durch Glycerin-Fettsäure-Acyltransferase (siehe Frentzen, 1998, *Lipid*, 100 (4–5): 161–166).

[0149] Veröffentlichungen über die pflanzliche Fettsäurebiosynthese und die Desaturierung, den Lipidmetabolismus und den Membrantransport von Lipidverbindungen, über die beta-Oxidation, Fettsäuremodifikation und Cofaktoren, die Triacylglycerin-Speicherung und den Triacylglycerin-Zusammenbau siehe einschließlich der Literaturstellen darin in den folgenden Arbeiten: Kinney, 1997, *Genetic Engineering*, Hrsg.: 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, Hrsg.: JK Setlow, 18: 111–13; Gerhardt, 1992, Prog. Lipid R. 31: 397–417; Gühnmann-Schäfer & Kindl, 1995, Biochim. Biophys Acta 1256: 181–186; Kursau 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, Hrsg.: Murata und Somerville, Rockville, American Society of Plant Physiologists, 150–158, Murphy & Ross 1998, Plant Journal. 13 (1): 1–16.

[0150] Die bei dem Verfahren produzierten PUFAs umfassen eine Gruppe von Molekülen, die höhere Tiere nicht mehr synthetisieren können und daher aufnehmen müssen, oder die höhere Tiere nicht mehr in ausreichenden Mengen synthetisieren können und daher zusätzliche Mengen aufnehmen müssen, obwohl sie leicht durch andere Organismen, wie Bakterien, synthetisiert werden können; zum Beispiel haben Katzen die Fähigkeit zur Synthese von Arachidonsäure im Verlauf der Evolution verloren.

[0151] "Phospholipide" sollen für die Zwecke der Erfindung Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerin und/oder Phosphatidylinositol, vorteilhafterweise Phosphatidylcholin, bedeuten. Die Begriffe "Produktion oder Produktivität" sind im Stand der Technik bekannt und umfassen die Konzentration des Fermentationsprodukts (der Verbindungen der Formel I), das in einem spezifischen Zeitraum und in einem spezifischen Fermentationsvolumen hergestellt wird (zum Beispiel kg Produkt pro Stunde pro Liter). Es umfasst auch die Produktivität innerhalb einer Pflanzenzelle oder einer Pflanze, d. h. den Gehalt der gewünschten Fettsäuren, die bei dem Verfahren produziert werden, relativ zum Gehalt sämtlicher Fettsäuren in dieser Zelle oder Pflanze. Der Begriff "Produktionseffizienz" umfasst die Zeit, die benötigt wird, um eine spezifische Produktionsmenge zu erhalten (zum Beispiel die Zeit, die von der Zelle benötigt wird, um eine bestimmte Durchsatzrate einer Feinchemikalie zu etablieren). Der Begriff "Ausbeute oder Produkt-/Kohlenstoffausbeute" ist im Stand der Technik bekannt und umfasst die Effizienz der Umwandlung der Kohlenstoffquelle in das Produkt (d. h. die Feinchemikalie). Dies wird in der Regel zum Beispiel als kg Produkt pro kg Kohlenstoffquelle ausgedrückt. Durch Erhöhen der Ausbeute oder der Produktion der Verbindung wird die Menge der Moleküle, die von dieser Verbindung erhalten werden, oder der geeigneten Moleküle, die von dieser Verbindung erhalten werden, in einer spezifischen Kulturmenge über einen festgelegten Zeitraum erhöht. Die Begriffe "Biosynthese oder Biosyntheseweg" sind im Stand der Technik bekannt und umfassen die Synthese einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Verbindung, durch eine Zelle aus Zwischenprodukten, zum Beispiel in einem Mehrschritt- und stark regulierten Verfahren. Die Begriffe "Katabolismus oder kataboler Weg" sind im Stand der Technik bekannt und umfassen die Spaltung einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Verbindung, durch eine Zelle, so dass Katabolite (allgemeiner ausgedrückt, kleinere oder weniger komplexe Moleküle) erhalten werden, zum Beispiel in einem Mehrschritt- und stark regulierten Verfahren. Der Begriff "Metabolismus" ist im Stand der Technik bekannt und umfasst die Gesamtheit der biochemischen Reaktionen, die in einem Organismus stattfinden. Der Metabolismus einer bestimmten Verbindung (zum Beispiel der Metabolismus einer Fettsäure) umfasst somit die Gesamtheit der Biosynthesewege, Modifikationswege und katabolen Wege dieser Verbindung in der Zelle, die mit dieser Verbindung in Zusammenhang stehen.

[0152] Indem man bei dem erfindungsgemäßen Verfahren die erfindungsgemäßen Polynukleotide und gegebenenfalls weitere Polynukleotide einsetzt, die für Enzyme des Lipid- oder Fettsäuremetabolismus kodieren, ist es möglich, verschiedene vorteilhafte Wirkungen zu erzielen. So ist es möglich, die Ausbeute, Produktion und/oder Produktionseffizienz der mehrfach ungesättigten Fettsäuren in einer Pflanze, vorzugsweise in einer Ölpflanze, oder in einem Mikroorganismus zu beeinflussen. Die Anzahl oder die Aktivität der erfindungsgemäßen Polypeptide oder Polynukleotide können erhöht werden, so dass größere Mengen der Genprodukte und schließlich größere Mengen der Verbindungen der allgemeinen Formel I produziert werden. Eine de novo-Synthese in einem Organismus, dem, bevor das/die in Frage kommende(n) Gen(e) eingebracht wurde(n), die Aktivität und die Fähigkeit, die Verbindungen zu biosynthetisieren, fehlte, ist ebenfalls möglich. Dasselbe gilt analog für die Kombination mit weiteren Desaturasen oder Elongasen oder weiteren Enzymen des Fettsäure- und Lipidmetabolismus. Die Verwendung einer Vielzahl von divergenten Sequenzen, d. h. Sequenzen, die sich auf der Ebene der DNA-Sequenz unterscheiden, kann in diesem Zusammenhang ebenfalls vorteilhaft sein, oder auch die Verwendung von Genexpressionspromotoren, die insofern eine unterschiedliche Genexpression ermöglichen, als die zeitliche Steuerung in Betracht gezogen wird, zum Beispiel als Funktion des Reifungsgrades eines Samens oder ölspeichernden Gewebes.

[0153] Indem man in einen Organismus ein erfindungsgemäßes Polynukleotid allein oder in Kombination mit anderen Genen in eine Zelle einbringt, ist es möglich, nicht nur den biosynthetischen Fluss in Richtung zum Endprodukt zu erhöhen, sondern auch die entsprechende Triacylglycerin-Zusammensetzung zu erhöhen oder de novo zu erzeugen. Ebenso können die Anzahl oder die Aktivität anderer Gene, die für den Import von Nährstoffen für die Biosynthese von einer oder mehreren Fettsäuren, Ölen, polaren und/oder neutralen Lipiden erforderlich sind, gesteigert werden, so dass die Konzentration dieser Vorstufen, Cofaktoren oder Zwischenpro-

dukte in den Zellen oder in dem Speicherkompartiment erhöht wird, wodurch die Fähigkeit der Zellen, PUFAs zu produzieren, weiter verstärkt wird. Durch Optimieren der Aktivität oder Erhöhen der Anzahl von einem oder mehreren erfindungsgemäßen Polynukleotiden oder Polypeptiden, die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind, oder durch Zerstören der Aktivität von einem oder mehreren Genen, die an dem Abbau dieser Verbindungen beteiligt sind, kann es möglich sein, die Ausbeute, Produktion und/oder Produktionseffizienz von Fettsäure- und Lipidmolekülen aus Organismen, insbesondere aus Pflanzen, zu erhöhen. Die bei dem Verfahren erhaltenen Fettsäuren sind als Ausgangsmaterialien für die chemische Synthese weiterer Produkte von Interesse geeignet. Zum Beispiel können sie, entweder allein oder in Kombination miteinander, zur Herstellung von Pharmazeutika, Nahrungsmitteln, Tierfutter oder Kosmetika verwendet werden.

[0154] Aus dem vorstehend Ausgeführten ist ersichtlich, dass die Erfindung auch ein Verfahren zur Herstellung einer Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung betrifft, das die Schritte des erfindungsgemäßen Verfahrens und den weiteren Schritt der Formulierung der Substanz als eine Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung umfasst.

[0155] In einer bevorzugten Ausführungsform dieses Verfahrens wird die Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung weiterhin derart formuliert, dass ein Arzneimittel, ein Kosmetikprodukt, ein Nahrungsmittel, ein Futtermittel, vorzugsweise Fischfutter, oder eine Nahrungsmittelergänzung erhalten wird.

[0156] Schließlich betrifft die Erfindung das Prinzip der Verwendung des erfindungsgemäßen Polynukleotids, des erfindungsgemäßen Vektors, der erfindungsgemäßen Wirtszelle, des erfindungsgemäßen Polypeptids oder des erfindungsgemäßen transgenen, nicht-menschlichen Organismus zur Herstellung einer Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung. Die Letztere sollte dann vorzugsweise als Arzneimittel, Kosmetikprodukt, Nahrungsmittel, Futtermittel, vorzugsweise Fischfutter, oder Nahrungsmittelergänzung eingesetzt werden.

[0157] Der Inhalt sämtlicher Literaturstellen, Patentanmeldungen, Patente und veröffentlichten Patentanmeldungen, die in der vorliegenden Patentanmeldung genannt werden, wird hiermit durch Bezugnahme auf die jeweilige spezifische Offenbarung eingeschlossen.

Figuren

[0158] Fig. 1: Biosynthesewege zur Herstellung von langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wie Arachidonsäure (= ARA, C20:4 Δ 5,8,11,14), Eicosapentaensäure (= EPA, C20:5 Δ 5,8,11,14,17) oder Docosahexaensäure (= DHA, C22:6 Δ 4,7,10,13,16,19).

[0159] Fig. 2: Gaschromatographische Bestimmung der Fettsäuren aus Hefen, die mit dem Plasmid pYES (A) oder pYES-d15Des(Ch) (B) beziehungsweise pYES-d15Des(Cy) (C) transformiert worden sind.

Beispiele

Beispiel 1: Allgemeine Klonierungsverfahren

[0160] Die Klonierungsverfahren, wie zum Beispiel Restriktionsspaltungen, Agarosegelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrocellulose und Nylonmembranen, Verknüpfung von DNA-Fragmenten, Transformation von *Escherichia coli*-Zellen, Bakterienkulturen und die Sequenzanalyse von rekombinanter DNA wurden durchgeführt, wie von Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) beschrieben.

Beispiel 2: Sequenzanalyse von rekombinanter DNA

[0161] Rekombinante DNA-Moleküle wurden mit einer ABI-Laser-Fluoreszenz-DNA-Sequenzierapparatur durch das Verfahren von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA74, 5463–5467) sequenziert. Durch Polymerasekettenreaktion erhaltene Fragmente wurden sequenziert und überprüft, um Polymerase-Fehler in Konstrukten, die exprimiert werden sollten, zu vermeiden.

Beispiel 3: Lipidextraktion aus Hefen

[0162] Die Wirkung der genetischen Modifikation in Pflanzen, Pilzen, Algen, Ciliaten oder auf die Produktion einer gewünschten Verbindung (wie einer Fettsäure) kann bestimmt werden, indem man die modifizierten Mikroorganismen oder die modifizierte Pflanze unter geeigneten Bedingungen (wie den vorstehend beschrie-

benen) züchtet und das Medium und/oder die zellulären Komponenten hinsichtlich der erhöhten Produktion des gewünschten Produkts (d. h. von Lipiden oder einer Fettsäure) analysiert. Diese Analysetechniken sind dem Fachmann bekannt und umfassen Spektroskopie, Dünnschichtchromatographie, verschiedene Typen von Farbeverfahren, enzymatische und mikrobiologische Verfahren und analytische Chromatographie, wie Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (siehe zum Beispiel Ullman, Encyclopedia of Industrial 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; Better, P. A., et al. (1988) Bioseparations: downstream processing for Biotechnology, John Wiley and 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).

[0163] Zusätzlich zu den vorstehend genannten Verfahren werden Pflanzenlipide aus Pflanzenmaterial extrahiert, 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. Die qualitative und quantitative Analyse von Lipiden oder Fettsäuren ist beschrieben in Christie, William W., Advances in Lipid Methodology, Ayr/Scotland: Oily Press (Oily Press Lipid Library; 2); 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) unter dem Titel: Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids CODEN.

[0164] Zusätzlich zur Messung des Endprodukts der Fermentation ist es auch möglich, andere Komponenten der Stoffwechselwege zu analysieren, die zur Herstellung der gewünschten Verbindung verwendet werden, wie Zwischenprodukte und Nebenprodukte, um die Gesamt-Produktionseffizienz der Verbindung zu bestimmen. Die Analyseverfahren umfassen die Messung der Menge an Nährstoffen im Medium (zum Beispiel Zucker, Kohlenwasserstoffe, Stickstoffquellen, Phosphat und andere Ionen), die Messung der Biomassezusammensetzung und des Wachstums, die Analyse der Produktion herkömmlicher Metaboliten von Biosynthesewegen und die Messung von Gasen, die während der Fermentation gebildet werden. Standardverfahren für diese Messungen sind in Applied Microbial Physiology; A Practical Approach, P. M. Rhodes und P. F. Stanbury, Hrsg., IRL Press, S. 103–129; 131–163 und 165–192 (ISBN: 0199635773) und darin genannten Literaturstellen beschrieben.

[0165] Ein Beispiel ist die Analyse von Fettsäuren (Abkürzungen: FAME, Fettsäuremethylester; GC-MS, Gas-Flüssigkeits-Chromatographie/Massenspektrometrie; TAG, Triacylglycerin; TLC, Dünnschichtchromatographie).

[0166] Ein eindeutiger Beweis für das Vorliegen von Fettsäureprodukten kann erhalten werden, indem man rekombinante Organismen unter Verwendung von Standard-Analyseverfahren: GC, GC-MS oder TLC, analysiert, wie an mehreren Stellen von Christie und den Literaturstellen darin beschrieben (1997, in: Advances on Lipid Methodology, Vierte Ausgabe: Christie, Oily Press, Dundee, 119–169; 1998, Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Verfahren [gas chromatography/mass spectrometry methods], Lipide 33: 343–353).

[0167] Das Material, das analysiert werden soll, kann durch Ultraschallbehandlung, Mahlen in einer Glasmühle, flüssigen Stickstoff und Mahlen oder über andere anwendbare Verfahren aufgebrochen werden. Nach dem Aufbrechen muss das Material zentrifugiert werden. Das Sediment wird in destilliertem Wasser resuspendiert, für 10 Minuten bei 100°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und erneut zentrifugiert, gefolgt von Extraktion für eine Stunde bei 90°C in 0,5 M Schwefelsäure in Methanol mit 2% Dimethoxypropan, 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 Quarzglas, CP-Wax-52 CB, 25 Mikrometer, 0,32 mm) bei einem Temperaturgradienten zwischen 170°C und 240°C für 20 Minuten und 5 Minuten bei 240°C unterzogen. Die Identität der erhaltenen Fettsäuremethylester muss unter Verwendung von Standards definiert werden, die aus kommerziellen Quellen (d. h. Sigma) erhältlich sind.

Beispiel 4: Klonierung von Desaturase-Genen

[0168] Der Pilz *Mycocentrospora acerina* wurde für fünf Tage bei 25°C in 50 ml flüssigem Medium (3 g/l He-feextrakt, 3 g/l Malzextrakt, 3 g/l Pepton, 10 g/l Glucose, 0,68 g/l K₂HPO₄ pH 6,0) auf einem Schüttler bei 200

U/min gezüchtet. Nachdem die Zellen durch Zentrifugation bei $2000 \times g$, 5 min, 4°C , geerntet worden waren, wurden 2 g Zellsediment erhalten. Das Sediment wurde 3x mit destilliertem Wasser gewaschen. Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des RNeasy Pflanzen-Minikits (Quiagen, Hilden, Deutschland) gemäß den Anleitungen des Herstellers isoliert. Diese RNA wurde dazu eingesetzt, "5'-RACE-ready"- und "3'-RACE ready"-cDNA unter Verwendung des SMART RACE cDNA-Amplifikationskits (Clontech, Heidelberg, Deutschland) nach den Anleitungen des Herstellers zu erhalten. Zur Isolation neuer Desaturase-Gene wurden die nachstehenden degenerierten Primer in Kombination mit der "5'-RACE ready"-cDNA eingesetzt:

Deg.1 (SEQ ID Nr.: 42):

5'-TGGGTI(C/T)T(T/C/G)GCICA(C/T)GA(A/G)TG(C/T)GG(AT/C)CA-3'

Deg.2 (SEQ ID Nr.: 43):

5'-TTIGG(A/G)TCIGT(A/G)TG(C/T)TG(A/C/G)A(A/G)(A/G)AAIGT-3'

[0169] Das folgende PCR-Protokoll wurde für die Amplifikation eingesetzt:

- a) 2 min bei 95°C ,
- b) 30 s bei 94°C
30 s bei $55\text{--}72^{\circ}\text{C}$
2 min bei 72°C
- Anzahl der Zyklen: 30
- c) 10 min bei 72°C

[0170] Die PCR-Amplifikate wurden sequenziert, nachdem sie in pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gemäß den Anleitungen des Herstellers kloniert worden waren. Eine Sequenz zeigte Homologie zu bekannten Δ -12- und Δ -15-Desaturasen (Sayanova O et al. J. Biol. Chem., 2006, 281, 36533–36541) im ClustalW-Alignment (Thompson JD, et al., Nucleic Acids Res., 1994, 22: 4673–4680). Dieser bekannte Sequenzabschnitt wurde an beiden Enden (5' und 3') durch Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) mithilfe des SMART RACE cDNA-Amplifikationskits (Clontech, Heidelberg, Deutschland) verlängert. Zu diesem Zweck wurden die nachstehenden sequenzspezifischen Primer aus der bekannten Sequenzregion abgeleitet:

5RACE1 (SEQ ID Nr.: 44): 5'-ATGAAGACCATGTCGCGCTCCATGT-3'

3RACE1 (SEQ ID Nr.: 45): 5'-GACGAGCACCTCATCCTGCTTAG-3'

[0171] Diese Primer ergaben in Kombination mit der "5'-RAGE ready"- oder "3'-RACE ready"-cDNA aus dem Pilz *Mycocentrospora acerina* die vollständige mRNA-Sequenz (SEQ ID Nr.: 15, Tabelle 1).

[0172] Für die anderen aufgeführten Kandidatensequenzen wurden vollständige genomische Sequenzen in einem ersten Schritt anhand von Datenbankeinträgen identifiziert. In einem weiteren Schritt wurde die kodierende Sequenz mithilfe von Bioinformatik-Verfahren extrahiert. Um die entsprechende kodierende Sequenz aus den Organismen zu erhalten, kann diese in einer PCR-Reaktion von cDNA-Präparationen unter Verwendung der in Tabelle 1 definierten Primersequenzen amplifiziert werden. Dies kann zu Fragmenten führen, wie sie in Tabelle 2 beschrieben sind.

[0173] Durch eine Suche nach konservierten Regionen in den von der DNA abgeleiteten Proteinsequenzen der Organismen *Cochliobolus heterosirophus* C5, *Cyanothece* sp. CCY0110 und *Mycocentrospora acerina* war es möglich, Sequenzen mit putativer Δ 12-Desaturase-Aktivität oder Δ 15-Desaturase-Aktivität zu identifizieren. Insbesondere wenn eine Aufeinanderfolge des Desaturase-Motivs 1 "GX10HX3HX13GX9PX3WX3H" (SEQ ID Nr: 46), des Desaturase-Motivs 2 "PX14(H/Q)H" (SEQ ID Nr: 47) und entweder des Desaturase-Motivs 3 "HX2HHX5PXY" (SEQ ID Nr: 48) oder des Desaturase-Motivs 4 "HK2HHX6PXY" (SEQ ID Nr: 49) in der Sequenz gefunden wird, ist dies ein Hinweis auf Δ 12-Desaturasen oder Δ 15-Desaturasen, wobei X für eine beliebige Aminosäure steht. Ob es sich um eine putative Δ 12-, Δ 15- oder omega3-Desaturase handelt, kann aus der Aminosäure an der variablen Position 16 des Desaturase-Motivs 2 (H oder Q) abgeleitet werden: Q = Glutamin ist ein Hinweis auf putative Δ 12-Desaturasen, H = Histidin ist ein Hinweis auf putative Δ 15- oder omega3-Desaturasen.

Tabelle 1: Primersequenzen für die Klonierung der Desaturasen, die identifiziert worden sind.

Bezeichnung des Gens	Organismus	Primersequenz (5'-3')	SEQ ID Nr:
D15Des(Ch)	Cochliobolus heterostrophus C5	vorwärts: atgattacgactacgcacc	4
		revers: ttaagccttggtcttgacc	6
D15Des(Cy)	Cyanothecce sp. CCY0110	vorwärts: atgcagcaacctatgactgtg	11
		revers: ttaaaactttctagattcac	13
D12Des(Mac)	Mycocentro spora acerina	vorwärts: atggcctcgaccaccgcccgc	18
		revers: ttactcgtgtcactctcag	19
ω3Des(Hp)	Hyaloperonospora parasitica	vorwärts: atggcgaccaagcaatcgg	53
		revers: ctaagctgctttggcatcac	55

Tabelle 2: Kodierende Polynukleotid- oder Aminosäuresequenzen der Desaturasen, die identifiziert worden sind.

Bezeichnung des Gens	Organismus	Nukleotide in bp	SEQ ID Nr.:	Aminosäuren	SEQ ID
D15Des(Ch)	Cochliobolus heterostrophus C5	1215	2	404	3
D15Des(Cy)	Cyanothecce sp. CCY0110	1050	9	349	10
D12Des(Mac)	Mycocentrospora acerina	1488	16	495	17
ω3Des(Hp)	Hyaloperonospora parasitica	1086	51	361	52

Tabelle 3: Genomische Sequenzen (gDNA) oder Transkriptsequenzen (mRNA) der Desaturasen, die identifiziert worden sind.

Bezeichnung des Gens	Organismus	Typ der Sequenz	Nukleotide in bp	SEQ ID
D15Des(Ch)	Cochliobolus heterostrophus C5	gDNA	1870	1
D15Des(Cy)	Cyanothecce sp. CCY0110	gDNA	1667	4
D12Des(Mac)	Mycocentrospora acerina	mRNA	1932	7
ω3Des(Hp)	Hyaloperonospora parasitica	gDNA	1300	50

[0174] Zur Charakterisierung der Funktionen der einzelnen Sequenzen wird der offene Leserahmen der DNA (Tabelle 2) stromabwärts des Galactose-induzierbaren GAL1-Promotors von pYES2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen) kloniert, wodurch die Plasmide pYES-D15Des(Ch), pYES-D15Des(Cy) oder pYes-D12Des(Mac) erhalten werden. Dann können diese Plasmide nach den Anleitungen des Herstellers in den Hefestamm INVSC-1 (Invitrogen) transformiert und auf Platten mit DOB-U-Agar auf Uracil-Auxotrophie selektiert werden. Positive Kolonien werden durch PCR identifiziert. Zu diesem Zweck wird eine PCR jedes Mal mit 1 µl aufgetauten Zellen, 200 µM dNTPs, 2,5 U Taq-Polymerase und 100 pmol jedes Primers in einem Gesamtvolumen von 50

µl durchgeführt. Die PCR-Bedingungen sind wie folgt: zuerst 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 und ein letzter Elongationsschritt bei 72°C für 10 Minuten. Parallel wird der leere Vektor pYES2.1/V5-His-TOPO auf die vorstehend beschriebene Weise in kompetente Hefezellen des Stamms INVSC-1 transformiert. Hefezellen mit den Plasmiden pYES-D15Des(Ch), pYES-D15Des(Cy) oder pYes-D12Des(Mac) werden für 12 Std in flüssigem BOB-U-Medium bei 28°C und 200 U/min inkubiert und dann für weitere 12 Std. in Induktionsmedium (DOB-U + 2% (w/v) Galactose + 2% (w/v) Raffinose) und 250 µM Fettsäuren, die in das Medium zugegeben werden, gezüchtet. Die Spezifität und Aktivität des Gens, das charakterisiert werden soll, kann anhand der zugegebenen Fettsäuren bestimmt werden.

[0175] Hefen, die mit den Plasmiden pYES2/V5-His-TOPO oder pYES-D15Des(Ch), pYES-D15Des(Cy) oder pYes-D12Des(Mac) transformiert worden sind, werden wie folgt analysiert:

Die Hefezellen aus den Hauptkulturen werden durch Zentrifugation (100 × g, 5 min, 20°C) geerntet und mit 100 mM NaHCO₃, pH 8,0 gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Ausgehend von den Hefezellsedimenten werden Fettsäuremethylester (FAMES) durch saure Methanolyse hergestellt. Zu diesem Zweck werden die Zellsedimente für eine Stunde bei 80°C zusammen mit 2 ml 1 N methanolischer Schwefelsäure und 2% (v/v) Dimethoxypropan inkubiert. Die FAMES werden zweimal mit Petrolether (PE) extrahiert. Zur Entfernung der nicht derivatisierten Fettsäuren werden die organischen Phasen in jedem Fall einmal mit 2 ml 100 mM NaHCO₃, pH 8,0, und 2 ml destilliertem Wasser gewaschen. Danach werden die PE-Phasen mit Na₂SO₄ getrocknet, unter Argon verdampft und in 100 µl PE aufgenommen. Die Proben werden auf einer DB-23-Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, Agilent) in einem Hewlett-Packard 6850-Gaschromatographen, der mit Flammenionisationsdetektor ausgerüstet ist, aufgetrennt. Die Bedingungen für die GLC-Analyse sind wie folgt: Die Ofentemperatur wurde von 50°C bis 250°C mit einem Anstieg von 5°C/min und schließlich 10 min bei 250°C (Halten) programmiert.

[0176] Die Signale werden identifiziert, indem die Retentionszeiten mit entsprechenden Fettsäurestandards (Sigma) verglichen werden. Die Methodik ist zum Beispiel in Napier und 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, *FERS Letters*. 439(3): 215–218 beschrieben.

[0177] Aktivitäts- und Substratbestimmung der Desaturasen, die identifiziert worden sind Die Substratspezifität von D15Des(Ch) oder D15Des(Cy) kann nach Expression und nach der Zugabe von verschiedenen Fettsäuren bestimmt werden. Ausgehend von dem konservierten Desaturase-Motiv 2 (SEQ ID Nr. 47) wurde die folgende Aktivität für die kodierenden Sequenzen gefunden (Tabelle 4).

Tabelle 4: Aktivität der Desaturasen, die identifiziert worden sind

Bezeichnung	Organismus	Aktivität	Polynukleotid SEQ ID Nr.:	Polypeptid SEQ ID Nr.:
D15Des(Ch)	Cochliobolus heterostrophus C5	d12-Desaturase	2	3
D15Des(Cy)	Cyanothece sp. CCY0110	Δ15-Desaturase	5	6
ω3Des(Hp)	Hyaloperonospora parasitica	ω3-Desaturase	51	52

[0178] Diese Aktivitäten, die gefunden worden sind, wurden zusätzlich durch Expressieren der Desaturasen in Hefe überprüft. Tabelle 4A führt die Umwandlung von verschiedenen Fettsäuresubstraten in die erwarteten Fettsäureprodukte auf. Mit Ausnahme der Fettsäure 18:1n-9 wurden alle Substrate in dem Experiment zugeführt und sind deshalb im Überschuss vorhanden. **Fig. 2** zeigt die Chromatogramme der einzelnen Experimente.

Tabelle 4A: Fütterung von Hefen

Probenbezeichnung/zugeführte Fettsäure	beobachteter Reaktionsschritt		Umwandlungsrate (%)		beobachtet e Aktivität	Fig.
	Substrate (% des Gesamt-Fettsäuregehalts)	Produkt (% des Gesamt-Fettsäuregehalts)	erwartet	beobachtet		
leerer pYES2-Vektor/18:2n-9	18:2n-6 25,3	18:3n-3 0,0	-	-	-	4a
d15Des(Ch) / 18:2n-9	18:2n-6 6,3	18:3n-3 5,7	> 0	47,5	Δ15-Des.	4b
d15Des(Cy) / 18:2n-9	18:2n-6 13,0	18:3n-3 0,9	> 0	6,4	Δ15-Des.	4c
ω3Des(Hp) / 18:2n-9	18:2n-6 12,6	18:3n-3 0,0	> 0	0,0	-	
ω3Des(Hp) / 20:3n-6	20:3n-6 6,3	20:4n-3 0,6	> 0	8,6	ω3-Des	
ω3Des(Hp) / 20:4n-6	20:4n-6 5,7	20:5n-3 1,8	> 0	24,0	ω3-Des	

[0179] Zur Kontrolle des Assays der Δ15-Desaturase-Aktivität wurden Hefen mit dem leeren pYES-Vektor transformiert, die Fettsäure 18:2n-6 wurde zugeführt und das Fettsäureprofil wurde analysiert (**Fig. 2A**). Im Vergleich kann die zusätzliche Fettsäure 18:3n-3 in Hefen, die die Desaturasen d15Des(Ch) und d15Des(Cy) (**Fig. 2B**, **Fig. 2C**) exprimieren, beobachtet werden. Diese Desaturasen, die getestet worden sind, besitzen daher Δ15-Desaturase-Aktivität.

Beispiel 5: Produktion transgener Pflanzen zur Herstellung langkettiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren

[0180] Für die Produktion langkettiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren in Pflanzen werden verschiedenen Gene des Stoffwechselwegs auf einem binären Vektor kombiniert. Zur Herstellung der Fettsäure Eicosapentaensäure (20:5Δ5,8,11,14,17) werden die in Tabelle 5 beschriebenen Gene kombiniert. Analog werden zur

Herstellung der Fettsäure Docosahexaensäure (22:6 Δ 4,7,10,13,16,19) die in Tabelle B beschriebenen Gene kombiniert.

Tabelle 5: Genkombination zur Herstellung von Eicosapentaensäure

Gen	Aktivität	SEQ ID Nr.
D6Des(Pir)	Δ 6-Desaturase	22
D6Elo(Pp)	Δ 6-Elongase	31
D5Des(Tc)	Δ 5-Desaturase	25
ω 3-Des(Pi)	ω 3-Desaturase	28
D15Des(Ch)	Δ 12-Desaturase	2
D15Des(Cy)	Δ 15-Desaturase	9
D12Des(Mac)	Δ 12-/ Δ 15-Desaturase	16
ω 3Des(Hp)	ω 3-Desaturase	51

Tabelle 6: Genkombination zur Herstellung von Docosahexaensäure

Gen	Aktivität	SEQ ID Nr.
D6Des(Pir)	Δ 6-Desaturase	22
D6Elo(Pp)	Δ 6-Elongase	31
D5Des(Tc)	Δ 5-Desaturase	25
ω 3Des(Pi)	ω 3-Desaturase	28
D15Des(Ch)	(12-Desaturase	2
D15Des(Cy)	(15-Desaturase	9
ω 3Des(Hp)	ω 3-Desaturase	
D12Des(Mac)	(12-/15-Desaturase	16
D5Elo(Ot)	Δ 5-Elongase	34
D4Des(Tc)	Δ 4-Desaturase	37

[0181] Weiterhin wurden Transformationsvektoren auf der Basis von pSUN-USP für die Transformation von Pflanzen hergestellt. Zu diesem Zweck wurden NotI-Spaltstellen am 5'- und am 3'-Ende der kodierenden Sequenz unter Verwendung der nachstehenden Primerpaare (siehe Tabelle 7) eingebracht.

Zusammensetzung der PCR-Mischung (50 μ l):

5,00 μ l cDNA-Matrize
 5,00 μ l 10 \times Puffer (Advantage Polymerase) + 25 mM MgCl₂
 5,00 μ l 2 mM dNTP
 1,25 μ l von jedem Primer (10 pmol/ μ l)
 0,50 μ l Advantage Polymerase

[0182] Die Advantage Polymerase von Clontech wird eingesetzt.

PCR-Reaktionsbedingungen:

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

Tabelle 7: Primersequenzen (für Klonierungs-Transformationsvektoren auf der Basis von pSUN-USP)

Gen	Primer	SEQ ID Nr.
D6-Des(Pir)	Vorw: gcggccgcgccatggaggacccaagcctgg	23
	Rvs: gcggccgttacatcgctgggaactcgg	24
D5-Des(Tc)	Vorw: gcggccgcgccatgggcaagggcagcgaggg	26
	Rvs: gcggccgcgccctcagctcctgcttctgtgtc	27
O3-Des(Pi)	Vorw: gcggccgcgccatggcgacgaaggaggcgta	29
	Rvs: gcggccgcggttacgtggacttggctctggcc	30
D6-Elo(Pp)	Vorw: gcggccgcgccatggaggctgtggagagattc	32
	Rvs: gcggccgcgctcactcagtttagctccc	33
D15Des(Ch)	Vorw: gcggccgcgccatgattacgactacgcacc	5
	Rvs: gcggccgcggttaagccttggctctggacc	7
D15Des(Cy)	Vorw: gcggccgcgccatgcagcaacctatgactgtg	12
	Rvs: gcggccgcggttaaaacttctagattcac	14
D12Des(Mac)	Vorw: gcggccgcgccatggcctcgaccaccgcccgc	20
	Rvs: gcggccgcggttactcgtgtcactctcag	21
ω3Des(Hp)	Vorw: gcggccgcgccatggcgaccaagcaatcgg	54
	Rvs: gcggccgcgctaagctgcttggcatcac	56
D5Elo(Ot)	Vorw: gcggccgcgccatgagcgccctccggtgctgctg	35
	Rvs: gcggccgcggttagtcaattttc	36
D4Des(Tc)	Vorw: gcggccgcgccatgacggctcggctacgacgag	38
	Rvs: gcggccgcgctcaggcagcgctgccagg	39

[0183] Die PCR-Produkte werden mit dem Restriktionsenzym NotI für 4 Std. bei 37°C inkubiert. Der Pflanzen-Expressionsvektor pSUN300-USP wird auf dieselbe Weise inkubiert. Danach werden die PCR-Produkte und der 7624 bp große Vektor durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die DNA wird durch das Qiagen-Gelreinigungskit nach den Anleitungen des Herstellers gereinigt. Danach werden Vektor und PCR-Produkte ligiert. Das Rapid Ligation Kit von Roche wird zu diesem Zweck verwendet. Die hergestellten Plasmiden werden durch Sequenzieren überprüft.

[0184] pSUN300 ist ein Derivat des Plasmids 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 wurde von pSUN300 durch Insertion eines USP-Promotors in pSUN300 in Form eines EcoRI-Fragments hergeleitet. Das Polyadenylierungssignal ist das OCS-Gen aus dem Ti-Plasmid von *A. tumefaciens* (ocs-Terminator, Genbank Zugang V00088) (De Greve, H., Dhaese, P., Seurinck, J., Lemmers, M., Van Montagu, M. und 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 Zugang X56240), wobei ein Teil der nicht-kodierenden Region des USP-Gens in dem Promotor vorliegt. Das Promotorfragment, das eine Größe von 684 Basenpaaren hat, wurde durch eine PCR-Reaktion unter Verwendung von Standardverfahren mithilfe eines synthetisierten Primers und mithilfe eines im Handel erhältlichen T7-Standardprimers (Stratagene) amplifiziert.

(Primersequenz:

5'–GTCGACCCGCGGACTAGTGGGCCCTCTAGACCCGGGGGATCC
GGATCTGCTGGCTATGAA–3') [SEQ ID Nr.: 82].

[0185] Das PCR-Fragment wurde mit EcoRI/Sall nachgeschnitten und in den Vektor pSUN300 mit dem OCS-Terminator inseriert. Dies lieferte das Plasmid mit der Bezeichnung pSUN-USP, das für die Transformation von Pflanzen mit *Agrobacterium tumefaciens* eingesetzt werden kann.

a) Herstellung transgener Rapspflanzen (modifiziertes Verfahren
von Moloney et al., 1992, *Plant Cell Reports*, 8: 238–242)

[0186] Zur Herstellung transgener Rapspflanzen werden binäre Vektoren, wie die hier vorstehend beschriebenen pSUN Plasmide, in *Agrobacterium tumefaciens* C58C1:pGV2260 (Deblaere et al, 1984, *Nucl. Acids. Res.* 13, 4777–4788) transformiert. Eine 1:50-Verdünnung einer Übernachtskultur einer positiv transformierten Agrobakterien-Kolonie in Murashige-Skoog-Medium (Murashige und Skoog 1962 *Physiol. Plant.* 15, 473), das mit 3% Saccharose angereichert ist (3MS-Medium), wird für die Transformation von Rapspflanzen (cv. Westar) verwendet. Petiolen oder Hypokotyle von frisch gekeimten sterilen Rapspflanzen (in jedem Fall etwa 1 cm²) werden mit einer 1:50-Verdünnung von Agrobakterien für 5–10 Minuten in einer Petrischale inkubiert. Darauf folgt eine 3-tägige Co-Inkubation im Dunkeln bei 25°C auf 3MS-Medium, das mit 0,8% Bacto-Agar angereichert ist. Nach 3 Tagen wird die Züchtung mit 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit fortgesetzt und wird in einem 1-wöchigen Rhythmus auf MS-Medium, das mit 500 mg/l Claforan (Cefotaxim-Natrium), 50 mg/l Kanamycin, 20 µM Benzylaminopurin (BAP) und 1,6 g/l Glucose angereichert ist, fortgesetzt. Die wachsenden Sprosse werden auf MS-Medium überführt, das mit 2% Saccharose, 250 mg/l Claforan und 0,8% Bacto-Agar angereichert ist. Wenn nach drei Wochen keine Wurzeln gebildet worden sind, wird das Wachstumshormon 2-Indolbutyrinsäure zum Medium zugegeben, um die Wurzelbildung zu fördern.

[0187] Regenerierte Sprosse werden auf 2MS-Medium erhalten, das mit Kanamycin und Claforan angereichert ist, nach der Wurzelbildung in Boden überführt und nach der Kultivierung für zwei Wochen in einer Kammer mit regulierter Umgebung oder in einem Gewächshaus gezüchtet, die Blüte wird induziert, reife Samen werden geerntet und auf die Expression der Desaturase- oder Elongase-Gene mithilfe von Lipidanalysen analysiert, wie sie zum Beispiel in Qiu et al. 2001, *J. Biol. Chem.* 276, 31561–31566 beschrieben sind.

b) Herstellung transgener Leinpflanzen

[0188] Transgene Leinpflanzen können zum Beispiel durch das Verfahren von Bell et al., 1999, *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 35(6): 456–465 mithilfe von Partikelbeschuss hergestellt werden. Agrobakterien-vermittelte Transformationen können durchgeführt werden, wie zum Beispiel von Mlynarova et al. (1994), *Plant Cell Report* 13: 282–285 beschrieben.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Plant Science GmbH
 <120> Desaturasasen und Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren in transgenen Organismen
 <130> BPS66115PCDE
 <160> 56
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 1870
 <212> DNA
 <213> Cochliobolus heterostrophus C5
 <400> 1
 ttgaaatctc ggttcgagac ccactgttac gtaccgccat agacacgaag gcggtgtctg 60
 gtgcacatcg ctgccctcgc gacgttgaaa cgtatgtcgg gtccgttgag cttaggctgt 120
 atcaagggggc agagttttcg tgctcaacc agccgctatc ggtacaaaag gctgaccacc 180
 gtcccccccc gtgtctgaac gagtgtccct tccattccct ttcttcccaa ccatgattac 240
 gactacgcac cgtgtccacg aggctcctgt caagaccagg cttacggctg tggccgatgt 300
 ccggccccatt cccgacgtca agaccctcaa ggatgccatt cccgcaaaat gctttgagcg 360
 ctccatgctt cgctccttct cttacgtcgt ccgtgatctc attgtcgtct tctccctttt 420
 ctacgctgct gtgcccctgt ctgcctaga cgctccctgg ttcgtcacag ttcccctgtg 480
 ggccctatac agcttcgtcc agggctgttt cttcactggc ctctggattc ttgcccacga 540
 ttgcggccat gactctttct ccgagaacct caccgtcaac gccattaccg gctggttctt 600
 ccactgcatg ttgatggctc ctttcttcag ctggaagttc agccacgccc gccaccaccg 660
 ataccacaac cacatggaca aggacaccgt cttcgtgccc caccgcaagt ccgacgtcga 720
 ggccaagaag accaagccaa cctcctcga gaaaatcatg gaccactcag ccgctgacac 780
 gcccatcacc acggtcgctt ctctcatctt ccaccaagtc cttggctggc cagcttacat 840
 tctgatgaac gccggcgctg gcaagaagag cttgaccaag ggagaccgct aacttcttc 900
 ccgctacaag caaagtcatt tggatcccac tgcccacgta ttcaccccgt ctgaggctcc 960
 ttttgtcgtc ctgagcaatg tcggcctcat cctcacaatg actgctctgt atgtctggtc 1020
 ccgacgcgtt ggaacttcga ccgttcttct cgcgatggc ctcccctacc tctggatgaa 1080
 ccactggatc ggtaagcgtg tcgttcccc gagctgcaaa gtagtgaaaa ctaattctcc 1140
 acagtcgcta ttacttacct tcaccacact cccccgagg ctctcacta cgaggctgac 1200
 aactggactt ttatcaaggc cgtgcctca actgtggacc gtgattttgg cttcattggc 1260
 cgccacatct tccacggcat cattgagtac cacgtcgttc accacatggt cccgtaagtt 1320
 tgacctatac cgagccacca ccatgtcttg gtcactccaa ctcttcgctc tgagcccagc 1380
 tgacgtgtat tagacgcatt ccttctacc acgccgagga ggccacttgg gctattgccc 1440
 ctcttcttgg cgaacgctac atccagcaaa agaccaactt tttcggtgac ttgtggcaaa 1500

gcttcaccac ttgcaagacc gttgagccgg gcaactggcgt ccacgctgga ggattgggtct 1560
 ggtccaagac caaggcttaa ggcttgcgca gtttggtttg cgaaatgaaa cgaggcaaat 1620
 gaaattagac tctagacaat agaaggttta atccgatcct atctttcagt aatccccgggt 1680
 acatgcctaa acacaacttg gtgagatgat atgttggcac gaaagattta gttggtgctg 1740
 cttaggtgaa ttgccgactg atgacgtcgt gtgttgatca tctccgggtca cgtgaataca 1800
 caaggtgggtg caggcactcc aacttgittg agctgactga tcgagagaac tccttgatct 1860
 ccagaattaa 1870

<210> 2
 <211> 1215
 <212> DNA
 <213> Cochliobolus heterostrophus C5

<400> 2
 atgattacga ctacgcaccg tgtccacgag gtcctgtca agaccagget tacggetgtg 60
 gccgatgtcc ggcccattcc cgacgtcaag accctcaagg atgccattcc cgcaaaatgc 120
 tttgagcgct ccatgcttcg ctcttctct tacgtcgtcc gtgatctcat tgtcgtcttc 180
 tcccttttct acgctgctgt gcccctgtct cgcctagacg ctccctgggt cgtcacagtt 240
 cccctgtggg ccctatacag ctctgtccag ggctgtttct tcaactgggt ctggattett 300
 gcccacgatt gcggccatga ctctttctcc gagaacctca ccgtcaacgc cattaccggc 360
 tggttcctcc actgcatggt gatggctccc ttcttcagct ggaagttcag ccacgccccg 420
 caccaccgat accacaacca catggacaag gacaccgtct tcgtgcccc aagcaagtec 480
 gacgtcgagg ccaagaagac caagccaacc ctctctgaga aatcatgga ccaactcagc 540
 gctgacacgc ccatcatcac ggtcgtttct ctcatcttcc accaagtctc tggctggcca 600
 gtttacattc tgatgaacgc cggcgctggc aagaagagct tgaccaaggg agaccgctac 660
 acttcttccc gctacaagca aagtcatttg gatccactg cccacgtatt caccctgtct 720
 gaggtcctt ttgtcgtct gagcaatgtc ggcctcatcc tcacaatgac tgctctgtat 780
 gtctgggtccc gcagcgttgg aacttcgacc gttcttctcg cgtatggctc cccttacctc 840
 tggatgaacc actggatcgt cgctattact taccttcacc aactcacc cgaggctcct 900
 cactacgagg ctgacaactg gacttttatc aagggcgctg cctcaactgt ggaccgtgat 960
 tttggcttca ttggccgcca catcttccac ggcattcatt agtaccacgt cgttcaccac 1020
 atgttcccc gcattccctt ctaccacgcc gaggaggcca cttgggtat tgccccctct 1080
 cttggcgaac gctacatcca gcaaaagacc aactttttcg gtgacttgtg gcaaagcttc 1140
 accacttgca agaccgttga gccgggcact ggcgtccacg ctggaggatt ggtctggtec 1200
 aagaccaagg cttaa 1215

<210> 3
 <211> 404
 <212> PRT

<213> Cochliobolus heterostrophus C5

<400> 3

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

Thr Ala Leu Tyr Val Trp Ser Arg Ser Val Gly Thr Ser Thr Val Leu
 260 265 270

Leu Ala Tyr Gly Leu Pro Tyr Leu Trp Met Asn His Trp Ile Val Ala
 275 280 285

Ile Thr Tyr Leu His His Thr His Pro Glu Ala Pro His Tyr Glu Ala
 290 295 300

Asp Asn Trp Thr Phe Ile Lys Gly Ala Ala Ser Thr Val Asp Arg Asp
 305 310 315 320

Phe Gly Phe Ile Gly Arg His Ile Phe His Gly Ile Ile Glu Tyr His
 325 330 335

Val Val His His Met Phe Pro Arg Ile Pro Phe Tyr His Ala Glu Glu
 340 345 350

Ala Thr Trp Ala Ile Ala Pro Leu Leu Gly Glu Arg Tyr Ile Gln Gln
 355 360 365

Lys Thr Asn Phe Phe Gly Asp Leu Trp Gln Ser Phe Thr Thr Cys Lys
 370 375 380

Thr Val Glu Pro Gly Thr Gly Val His Ala Gly Gly Leu Val Trp Ser
 385 390 395 400

Lys Thr Lys Ala

<210> 4
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> künstlich

<220>
 <223> Primer

<400> 4
 atgattacga ctacgcacc

19

<210> 5
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> künstlich

<220>
 <223> Primer

<400> 5
 gcggccgcgc catgattacg actacgcacc

30

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> künstlich

<220>
 <223> Primer
 <400> 6
 ttaagccttg gtcttggacc 20

<210> 7
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> künstlich

<220>
 <223> Primer
 <400> 7
 gcggccgcgt taagccttgg tcttggacc 29

<210> 8
 <211> 1667
 <212> DNA
 <213> Cyanothece sp. CCY0110

<400> 8
 gagatgatga cttaacccgt acctttcgtc gaaatcctcc attaccacca cgaggagaat 60
 ggaacgatta aaggattttg ctttttgta ctaatgtcgg taaacagtcc ccaagctata 120
 aagggcgcaa gttttgcgc ttttaatttt gaaagtagaa aaaattgacc ccaacaccat 180
 ctagagcaaa ggttcttgaa gtagtaactt gtaacagtag agtatgtcaa ctgctaatag 240
 tataataggt aagattaaga aaaattaagt ttttctcgac attaggttta aataaggaga 300
 tccaacagcg aatgcagcaa cctatgactg tgaagcgacc agaaccaaaa gtggtcgacc 360
 taccttttac gttacaagat attagagaag ccatccccc tcattgtttt gagtcatctg 420
 ctataaaatc cctggcttat ttttttggg atatttttgt catatctgtt ctatatgcga 480
 tcgcttattc tttggattct tggttttttt ggccgatttt ttgggtcatg caaggaacta 540
 tgttttgggc attatttgtt gtcggacatg attgtggcca tggttctttt tctcgctaca 600
 aatggttaaa taatctcatt ggtcatcttt cccatactcc catttttagtc ccatttcatg 660
 ggtggcgtat tagtcatcgc actcatcata aaaatactgg taatattgat acggatgaaa 720
 gttggtatcc tatcacagaa tctaaatata atgagatggg atggttagaa aagtttgccc 780
 gttttaaact ggttttattt ctgtatectc tttatttatt taagcgttcc ccaggagaaa 840
 aaggaagtca tttcgatcct aagagcgatc tattccgtcc atctgaaaaa tgggatgttt 900
 taactagcac tatttgcttg attggtatgg ttgctttgtt aggtttttta acttatcaat 960
 tcggcttttt gtggttactt aaatattatt taggacctta tcttgttttt gtgatttggg 1020
 tagatttagt taccttttta catcacaactg atcctgatgt tccttgggtat cgggggaaag 1080
 attggtactt tttaaaaggg gcattatcta cggtagatca tgattatggg tttatcaatg 1140
 atatccatca taatattggg actcatgttg ctcatcatat ctttttgacc atgcctcatt 1200
 accatttaaa aaccgcaaca gaagccatta aaccggtttt aggtgactat tatcgtaagt 1260

caaattactc tatttttagaa gcattttattc ggggctācaa tattttgtcat gtggttcccg 1320
 atgaaggggg taaggtttat tgtgaatcta gaaagtttta agttttaatt cttctttcta 1380
 gttataaaaa acacaatcga attaataataa aaaaggggaag gtatttaata agtatcttcc 1440
 ttttactata gaatgaagaa aaaaaataaa atttcaaatt tcctagtata aatatatttg 1500
 caaagaatta tagagaagtt aatgtaaac aagatcaaga aaacaagtta ataaaaaaat 1560
 ggaattaga agagaataat ttatattcat tatgaatgta atacattgat ctattggttaa 1620
 cttttccaat ttttagaata attctgtaac ctattgtaaa aacagaa 1667

<210> 9
 <211> 1050
 <212> DNA
 <213> Cyanothece sp. CCY0110

<400> 9
 atgcagcaac ctatgactgt gaagcgacca gaaccaaaaag tggctcgacct accttttacg 60
 ttacaagata ttagagaagc catccccct cattgttttg agtcatctgc tataaaatcc 120
 ctggcttatt ttttttggga tatttttgtc atatctgttc tatatgcat cgcttattct 180
 ttggattctt ggtttttttg gccgattttt tgggtcatgc aaggaactat gttttgggca 240
 ttatttggtg tcggacatga ttgtggccat ggttctttt ctcgctacaa atggttaaat 300
 aatctcattg gtcactttc ccatactccc attttagtcc catttcatgg gtggcgtatt 360
 agtcatcgca ctcatcataa aaatactggt aatattgata cggatgaaag ttggtatcct 420
 atcacagaat ctaaataataa tgagatggga tggtagaaa agtttgcccg ttttaactg 480
 gttttatttc tgtatcctct ttatttattt aagcgttccc caggagaaa aggaagtcatt 540
 ttcgatccta agagcgatct attccgtcca tctgaaaaat gggatgtttt aactagcact 600
 atttgcttga ttggtatggt tgctttgtta ggttttttaa cttatcaatt cggctttttg 660
 tggttactta aatattattt aggaccttat cttgtttttg tgatttggtt agatttagtt 720
 acctttttac atcacactga tcctgatggt ccttggtatc gggggaaaga ttggtacttt 780
 ttaaagggg cattatctac ggtagatcat gattatgggt ttatcaatga tatccatcat 840
 aatattggta ctcatgttgc tcatcatatc tttttgacca tgcctcatta ccatttaaaa 900
 accgcaacag aagccattaa acccgtttta ggtgactatt atcgtaatgc aaattactct 960
 attttagaag catttattcg gggctacaat atttgtcatg tggttcccga tgaagggggt 1020
 aaggtttatt gtgaatctag aaagttttaa 1050

<210> 10
 <211> 349
 <212> PRT
 <213> Cyanothece sp. CCY0110

<400> 10

Met Gln Gln Pro Met Thr Val Lys Arg Pro Glu Pro Lys Val Val Asp
 1 5 10 15

Leu Pro Phe Thr Leu Gln Asp Ile Arg Glu Ala Ile Pro Pro His Cys
 20 25 30

Phe Glu Ser Ser Ala Ile Lys Ser Leu Ala Tyr Phe Phe Trp Asp Ile
 35 40 45

Phe Val Ile Ser Val Leu Tyr Ala Ile Ala Tyr Ser Leu Asp Ser Trp
 50 55 60

Phe Phe Trp Pro Ile Phe Trp Val Met Gln Gly Thr Met Phe Trp Ala
 65 70 75 80

Leu Phe Val Val Gly His Asp Cys Gly His Gly Ser Phe Ser Arg Tyr
 85 90 95

Lys Trp Leu Asn Asn Leu Ile Gly His Leu Ser His Thr Pro Ile Leu
 100 105 110

Val Pro Phe His Gly Trp Arg Ile Ser His Arg Thr His His Lys Asn
 115 120 125

Thr Gly Asn Ile Asp Thr Asp Glu Ser Trp Tyr Pro Ile Thr Glu Ser
 130 135 140

Lys Tyr Asn Glu Met Gly Trp Leu Glu Lys Phe Ala Arg Phe Lys Leu
 145 150 160

Val Leu Phe Leu Tyr Pro Leu Tyr Leu Phe Lys Arg Ser Pro Gly Arg
 165 170 175

Lys Gly Ser His Phe Asp Pro Lys Ser Asp Leu Phe Arg Pro Ser Glu
 180 185 190

Lys Trp Asp Val Leu Thr Ser Thr Ile Cys Leu Ile Gly Met Val Ala
 195 200 205

Leu Leu Gly Phe Leu Thr Tyr Gln Phe Gly Phe Leu Trp Leu Leu Lys
 210 215 220

Tyr Tyr Leu Gly Pro Tyr Leu Val Phe Val Ile Trp Leu Asp Leu Val
 225 230 235 240

Thr Phe Leu His His Thr Asp Pro Asp Val Pro Trp Tyr Arg Gly Lys
 245 250 255

Asp Trp Tyr Phe Leu Lys Gly Ala Leu Ser Thr Val Asp His Asp Tyr
 260 265 270

Gly Phe Ile Asn Asp Ile His His Asn Ile Gly Thr His Val Ala His
 275 280 285

His Ile Phe Leu Thr Met Pro His Tyr His Leu Lys Thr Ala Thr Glu
 290 295 300

Ala Ile Lys Pro Val Leu Gly Asp Tyr Tyr Arg Lys Ser Asn Tyr Ser
 305 310 315 320

Ile Leu Glu Ala Phe Ile Arg Gly Tyr Asn Ile Cys His Val Val Pro
 325 330 335

Asp Glu Gly Gly Lys Val Tyr Cys Glu Ser Arg Lys Phe
 340 345

<210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> künstlich

<220>
 <223> Primer

<400> 11
 atgcagcaac ctatgactgt g 21

<210> 12
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> künstlich

<220>
 <223> Primer

<400> 12
 gcggccgcgc catgcagcaa cctatgactg tg 32

<210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> künstlich

<220>
 <223> Primer

<400> 13
 ttaaaacttt ctagattcac 20

<210> 14
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> künstlich

<220>
 <223> Primer

<400> 14
 gcggccgcgt taaaactttc tagattcac 29

<210> 15
 <211> 1932
 <212> DNA

<213> Mycocentrospora acerina

<400> 15

accctctttc cctctttcc ttatcgagga ccctcacgac ttgcggttca gggcactcat	60
ccttgaacgg tcagcccaac aataagcgac ctgcatctca acaacagcac ctcaaccgtc	120
attcggttgc ctggtgtcct ttgaagcccc tccagcttct ttactgctcg ctgagacagc	180
cgctcctcgt gccattgcc tcaagcattca ctcgacacct tcaccatggc ctcgaccacc	240
gcccgcgctc aagcccctgt gctgaggcgc cacgttacca ccgagtctgt gccctccacc	300
atggccaact cgcccaacga ctcgcccac ggctccgctt ccaacacgtc gctgtcgtcg	360
ctcggctccg tcgacgacgt gcaggccaag aaggcatcca acggtgtcct tctcgacacg	420
tacggcaacg agttcaagat ccctgacttc accatcaagg acatccgcga tgccatcccc	480
aagcactgct tcgagcgctc tgccgcccgc agtcttggct acggtgcccg cgacctggcc	540
atgctcgcca ccaccttcta cctctcctac acattcatca ggccccgagta catctcctcc	600
aaggccgtcc gcgcccgtgt gtgggctgga tacactgtca tccagggctt tgttggcacc	660
ggtctctggg ttcttgcca cgagtgcggc caccaggcct tctccccctc caaggtgctc	720
aacgacaccg tcggctgggt ctgccactct ctctcctcg tcccctactt ctcatggaag	780
atctcccacg gcaagcacca caaggccacc ggccacatgg agcgcgacat ggtcttcatt	840
cccaagacc gcgacgtcta cgctaccctg gtcagcaagc ttatccacga gatctctgag	900
ctagccgagg agactcccat cgttaccttt atccacatgc tcggtcagca gattggcgga	960
tggcagatgt acctctttgc caacgtcact ggccacaccc accacgaccg tcagtccgag	1020
ggcaaggggtg ttggcaagca gaacggcatg ttcgggtggcg tcaaccactt caaccatcc	1080
agccctctgt acgagaagag ggacgagcac ctcatcctgc ttagcgatct tggccttgtc	1140
attgttatcg ctgctctgac ctacgttggc aagattcacg gcttctcaag tgcctcctg	1200
tggtacatca tcccttactt ctgggttcac cactggctcg tcatgatcac ctctctccag	1260
cacacggacc ctccccctgc ccactacgac gctgagacgt ggacctacgc ccgtggcgct	1320
ggtgcaacga ttgaccgca gtttggcttc attggacgca ctctgttcca cggcatcatt	1380
gagacgcacg ttctccacca ctacatctcg tcgattcctt tctacaacgc cgatgaggcc	1440
tctgaggcca tcaagaaggt catgggctcg cactaccgat ctgacgttga ggggtggctcc	1500
attggcttcc tcaagtcttt ctggaggagt gcccgcattg gccagtttgt cgagcccagc	1560
gaaggtgccg agggcgaggg caagggtgtg cttttcttcc gcaaccacaa tggcttggc	1620
gttcagcccc gcaagctgga tgcgtctggc aagcctgtcg ttagcaagcg cgccaccaag	1680
atggagggtg gccctgagag tgacaacgag taaagaggct gcaaggccct ttttctggac	1740
tagtgaggca aggttgattt ggggtgaagg gcgttttatg gtagcattga ctcgaagatt	1800
gactttttgg agctgggctg gttacttgat gataaatttt ttttcttctt tcgagcgta	1860
gagcttagac agcccaagac gatagaagtc gatatcccac ttggaaaaaa aagaaaaaaa	1920
aaaaaaaaaa aa	1932

<210> 16
 <211> 1488
 <212> DNA
 <213> Mycocentrospora acerina

<400> 16
 atggcctcga ccaccgcccg cgctcaagcc cctgtgctga ggcgccacgt taccaccgag 60
 tctgtgccct ccaccatggc caactcgccc aacgactcgc ccaacggctc cgcctccaac 120
 acgtcgtgt cgtcgctcgg ctccgctcgc gacgtgcagg ccaagaaggc atccaacggt 180
 gtccttctcg acacgtacgg caacgagttc aagatccctg acttcacat caaggacatc 240
 cgcgatgcca tccccaaagca ctgcttcgag cgctctgccg cccgcagtct tggctacgtt 300
 gcccgcgacc tggccatgct cgccaccacc ttctacctt cctacacatt catcaggccc 360
 gagtacatct cctccaaggc cgtccgcgcc gtgctgtggg ctggatacac tgtcatccag 420
 ggtcttgttg gcaaccggtct ctgggttctt gcccacgagt gcgggcacca ggccttctcc 480
 cctccaagg tgctcaacga caccgtcggc tgggtctgcc actctctcct cctcgtcccc 540
 tacttctcat ggaagatctc ccacggcaag caccacaagg ccaccggcca catggagcgc 600
 gacatggtct tcattcccaa gacccgcgac gtctacgcta cccgtgtcag caagcttatc 660
 cacgagatct ctgagctagc cgaggagact cccatcgta ctttatcca catgctcggg 720
 cagcagattg gcggatggca gatgtacctc tttgccaacg tcaactggcca caccaccac 780
 gaccgtcagt ccgagggcaa ggggtgtggc aagcagaacg gcatgttcgg tggcgtcaac 840
 cacttcaacc catccagccc tctgtacgag aagagggacg agcacctcat cctgcttagc 900
 gatcttggcc ttgctattgt tatcgctgct ctgacctacg ttggcaagat tcacggcttc 960
 tcaagtgtcc tcgtgtggta catcatcctt tacttctggg ttcaccactg gctcgtcatg 1020
 atcaccttcc tccagcacac ggacccttcc ctgccccact acgacgctga gacgtggacc 1080
 tacgcccgtg gcgctggtgc aacgattgac cgcgagtttg gcttcattgg acgactctg 1140
 ttccacggca tcattgagac gcacgttctc caccactaca tctcgtcgat tcctttctac 1200
 aacgccgatg aggcctctga ggccatcaag aaggatcatg gctcgcacta ccgatctgac 1260
 gttgagggtg gctccattgg ctctctcaag tctttctgga ggagtgcccg catgtgccag 1320
 tttgtcgagc ccagcgaagg tgccgagggc gagggcaagg gtgtgctttt cttccgcaac 1380
 cacaatggtc ttggcgttca gccccgcaag ctggatgcgt ctggcaagcc tgtcgttagc 1440
 aagcgcgcca ccaagatgga ggtgggccct gagagtgaca acgagtaa 1488

<210> 17
 <211> 495
 <212> PRT
 <213> Mycocentrospora acerina

<400> 17

Met Ala Ser Thr Thr Ala Arg Ala Gln Ala Pro Val Leu Arg Arg His
 1 5 10 15

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

Tyr Glu Lys Arg Asp Glu His Leu Ile Leu Leu Ser Asp Leu Gly Leu
 290 295 300
 Ala Ile Val Ile Ala Ala Leu Thr Tyr Val Gly Lys Ile His Gly Phe
 305 310 315 320
 Ser Ser Val Leu Val Trp Tyr Ile Ile Pro Tyr Phe Trp Val His His
 325 330 335
 Trp Leu Val Met Ile Thr Phe Leu Gln His Thr Asp Pro Ser Leu Pro
 340 345 350
 His Tyr Asp Ala Glu Thr Trp Thr Tyr Ala Arg Gly Ala Gly Ala Thr
 355 360 365
 Ile Asp Arg Glu Phe Gly Phe Ile Gly Arg Thr Leu Phe His Gly Ile
 370 375 380
 Ile Glu Thr His Val Leu His His Tyr Ile Ser Ser Ile Pro Phe Tyr
 385 390 395 400
 Asn Ala Asp Glu Ala Ser Glu Ala Ile Lys Lys Val Met Gly Ser His
 405 410 415
 Tyr Arg Ser Asp Val Glu Gly Gly Ser Ile Gly Phe Leu Lys Ser Phe
 420 425 430
 Trp Arg Ser Ala Arg Met Cys Gln Phe Val Glu Pro Ser Glu Gly Ala
 435 440 445
 Glu Gly Glu Gly Lys Gly Val Leu Phe Phe Arg Asn His Asn Gly Leu
 450 455 460
 Gly Val Gln Pro Arg Lys Leu Asp Ala Ser Gly Lys Pro Val Val Ser
 465 470 475 480
 Lys Arg Ala Thr Lys Met Glu Val Gly Pro Glu Ser Asp Asn Glu
 485 490 495

<210> 18
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> künstlich

<220>
 <223> Primer

<400> 18
 atggcctcga ccaccgcccg c

21

<210> 19
 <211> 32

<212> DNA
 <213> künstlich

 <220>
 <223> Primer

 <400> 19
 gcggccgcgc catggcctcg accaccgcc gc 32

<210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> künstlich

 <220>
 <223> Primer

 <400> 20
 ttactcgttg tcactctcag 20

<210> 21
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> künstlich

 <220>
 <223> Primer

 <400> 21
 gcggccgcgt tactcgttgt cactctcag 29

<210> 22
 <211> 1380
 <212> DNA
 <213> *Pythium irregulare*

 <400> 22
 atggtggacc tcaagcctgg agtgaagcgc ctggtgagct ggaaggagat ccgcgagcac 60
 gcgacgcccg cgaccgcgtg gatcgtgatt caccacaagg tctacgacat ctccaagtgg 120
 gactcgcacc cgggtggctc cgtgatgctc acgcaggccc gcgaggacgc cacggacgcc 180
 ttcgcggtct tccaccgctc ctcggcgctc aagctgctcg agcagttcta cgtcggcgac 240
 gtggacgaaa cctccaaggc cgagatcgag ggggagccgg cgagcgacga ggagcgcgcg 300
 cgccgcgagc gcatcaacga gttcatcgcg tcctaccgct gtctgcgcgt caaggtaag 360
 ggcatggggc tctacgacgc cagcgcgctc tactacgcgt ggaagctcgt gagcacgttc 420
 ggcatcgcgg tgctctcgat ggcgatctgc ttcttctca acagtttcgc catgtacatg 480
 gtcgccggcg tgattatggg gctcttctac cagcagtccg gatggctggc gcacgacttc 540
 ttgcacaacc aggtgtgcga gaaccgcacg ctcggcaacc ttatcggctg cctcgtgggc 600
 aacgcctggc agggcttcag catgcagtgg tggaagaaca agcacaacct gcaccacgcg 660
 gtgccgaacc tgcacagcgc caaggacgag ggcttcatcg gcgacccgga catcgacacc 720
 atgccgetgc tggcgtggtc taaggagatg gcgcgcaagg cgttcgagtc ggcgcacggc 780
 ccgttcttca tccgcaacca ggcgttctca tacttcccgc tgctgctgct cgcgcgcctg 840

agctggctcg cgcagtcggt cttctacgtg ttcaccgagt tctcgttcgg catcttcgac 900
 aaggtcgagt tcgacggacc ggagaaggcg ggtctgatcg tgcactacat ctggcagctc 960
 gcgatcccgt acttctgcaa catgagcctg tttgagggcg tggcatactt cctcatgggc 1020
 caggcgtcct gcggcttgct cctggcgctg gtgttcagta ttggccacaa cggcatgtcg 1080
 gtgtacgagc gcgaaaccaa gccggacttc tggcagctgc aggtgaccac gacgcgcaac 1140
 atccgcgctg cggattcat ggactggttc accggtggct tgaactacca gatcgaccat 1200
 cacctgttcc cgctcgtgcc gcgccacaaac ttgccaaagg tcaacgtgct catcaagtcg 1260
 ctatgcaagg agttcgacat cccgttccac gagaccggct tctgggaggg catctacgag 1320
 gtcgtggacc acctggcgga catcagcaag gaattcatca ccgagtccc agcgatgtaa 1380

<210> 23
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> künstlich

<220>
 <223> Primer

<400> 23
 gcggccgctc catggtggac ctcaagcctg g 31

<210> 24
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> künstlich

<220>
 <223> Primer

<400> 24
 gcggccgcta catcgctggg aactcgg 27

<210> 25
 <211> 1320
 <212> DNA
 <213> Thraustochytrium sp.

<400> 25
 atgggcaagg gcagcgaggg ccgcagcgcg gcgcgcgaga tgacggccga ggcgaacggc 60
 gacaagcggg aaacgattct gatcgagggc gtctgttacg acgcgacgaa cttaagcac 120
 ccgggcgggt cgatcatcaa cttcttgacc gagggcgagg ccggcgtgga cgcgacgcag 180
 gcgtaccgag agtttcatca gcggtccggc aaggccgaca agtacctcaa gtcgctgccg 240
 aagctggatg cgtccaaggt ggagtcgagg ttctcggcca aagagcaggc gcggcgcgac 300
 gccatgacgc gcgactacgc ggcccttcgc gaggagctcg tcgccgaggg gtactttgac 360
 ccgtcgatcc cgcacatgat ttaccgcgtc gtggagatcg tggcgtctt cgcgctctcg 420
 ttctggctca tgtccaaggc ctgccccacc tcgctcgtgc tgggcgtggt gatgaacggc 480
 attgvcgagg gccgctcggc ctgggtcatg cacgagatgg gccacgggct gttcacgggc 540
 gtcctctggc tcgacgacc gatgtgcgag ttcttctacg gcgtcggctg cggcatgagc 600

gggcactact ggaagaacca gcacagcaag caccacgccg cgcccaaccg cctcgagcac 660
 gatgtcgatc tcaacacgct gcccctggtc gcctttaacg agcgcgctcgt gcgcaaggtc 720
 aagccgggat cgctgctggc gctctggctg cgcgtagcagg cgtacctctt tgcgcccgtc 780
 tcgtgcctgc tcatcggcct tggctggacg ctctacctgc acccgcgcta catgctgcgc 840
 accaagcggc acatggagtt cgtctggatc ttcgcgcgct acattggctg gttctcgctc 900
 atgggcgctc tcggctactc gccgggcacc tcggtcggga tgtacctgtg ctcgttcggc 960
 ctcggctgca tttacatttt cctgcagttc gccgtcagcc acacgcacct gccggtgacc 1020
 aacccggagg accagctgca ctggctcgag tacgcggccg accacacggg gaacattagc 1080
 accaagtctt ggctcgtcac gtggtggatg tcgaacctga actttcagat cgagcaccac 1140
 ctcttcccca cggcggcga gttccgcttc aaggaaatca gtcctcgcgt cgaggccctc 1200
 ttcaagcgc acaacctccc gtactacgac ctgccctaca cgagcgcggt ctcgaccacc 1260
 tttgccaatc tttattccgt cggccactcg gtcggcgccg acaccaagaa gcaggactga 1320

<210> 26
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> künstlich

<220>
 <223> Primer

<400> 26
 gcggccgcgc catgggcaag ggcagcgagg g 31

<210> 27
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> künstlich

<220>
 <223> Primer

<400> 27
 gcggccgcgc ctcagtcctg cttcttggg tc 32

<210> 28
 <211> 1086
 <212> DNA
 <213> *Phytophthora infestans*

<400> 28
 atggcgacga aggaggcga tgtgttcccc actctgacgg agatcaagcg gtcgctacct 60
 aaagactggt tcgaggcttc ggtgcctctg tcgctctact acaccgtgcg ttgtctggtg 120
 atcgcgggtg ctctaacctt cggctcaac tacgctcgcg ctctgcccga ggtcgagagc 180
 ttctgggctc tggacgccg actctgcacg ggctacatct tgctgcaggg catcgtgttc 240
 tggggcttct tcacggtggg ccacgatgcc ggccacggcg ctttctcgcg ctaccacctg 300
 cttaacttcg tgggtgggcac tttcatgcac tcgctcatcc tcacgccctt cgagtcgtgg 360

aagctcacgc accgtcacca ccacaagaac acgggcaaca ttgaccgtga cgaggtcttc 420
taccgcgaac gcaaggccga cgaccacccg ctgtctcgca acctgattct ggcgctcggg 480
gcagcgtggc tcgcctattht ggtcgagggc ttccctcctc gtaagggtcaa ccaacttcaac 540
ccgttcgagc ctctgttcgt gcgtcaggtg tcagctgtgg taatctctct tctcgcccac 600
ttcttcgtgg ccggactctc catctatctg agcctccagc tgggccttaa gacgatggca 660
atctactact atggacctgt ttttgtgttc ggcagcatgc tggtcattac caccttccta 720
caccacaatg atgaggagac cccatggtag gccgactcgg agtggacgta cgtcaagggc 780
aacctctcgt ccgtggaccg atcgtacggc gcgctcattg acaacctgag ccacaacatc 840
ggcacgcacc agatccacca ccttttccct atcattccgc actacaaact caagaaagcc 900
actgcgccct tccaccaggc tttccctgag ctcgtgcgca agagcgacga gcccaattatc 960
aaggttttct tccgggttgg acgtctctac gcaaactacg gcgttgtgga ccaggaggcg 1020
aagctcttca cgctaaagga agccaaggcg gcgaccgagg cggcggccaa gaccaagtcc 1080
acgtaa 1086

<210> 29
<211> 31
<212> DNA
<213> künstlich

<220>
<223> Primer

<400> 29
gcggccgcgc catggcgacg aaggaggcgt a 31

<210> 30
<211> 31
<212> DNA
<213> künstlich

<220>
<223> Primer

<400> 30
gcggccgcgc tacgtggact tggctttggc c 31

<210> 31
<211> 873
<212> DNA
<213> *Physcomitrella patens*

<400> 31
atggagggtcg tggagagatt ctacgggtgag ttggatggga aggtctcgca gggcgtgaat 60
gcattgctgg gtagtthttgg ggtggagttg acggatacgc ccaactaccaa aggcttgccc 120
ctcgttgaca gtcccacacc catcgtcctc ggtgtttctg tatacttgac tattgtcatt 180
ggagggcctt tgtggataaa ggccagggat ctgaaaccgc gcgcctcgga gccatttttg 240
ctccaagctt tgggtgcttg gcacaacctg ttctgttttg cgctcagtct gtatatgtgc 300
gtgggcatcg cttatcaggc tattacctgg cggctactctc tctggggcaa tgcatacaat 360

cctaaacata aagagatggc gattctggta tacttgttct acatgtctaa gtacgtggaa 420
 ttcattggata ccgttatcat gatactgaag cgcagcacca ggcaaataag cttcctccac 480
 gtttatcatc attcttcaat ttccctcatt tggtagggcta ttgctcatca cgctcctggc 540
 ggtgaagcat attggctctgc ggctctgaac tcaggagtgc atgttctcat gtatgcgtat 600
 tacttcttgg ctgcctgcct tcgaagtagc ccaaagttaa aaaataagta ctttttttgg 660
 ggcaggact tgacacaatt ccaaatgttc cagtttatgc tgaacttagt gcaggcttac 720
 tacgacatga aaacgaatgc gccatatcca caatggctga tcaagatfff gttctactac 780
 atgatctcgt tgctgtttct tttcggcaat ttttacgtac aaaaatacat caaacctct 840
 gacggaaagc aaaagggagc taaaactgag tga 873

<210> 32
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> künstlich

<220>
 <223> Primer

<400> 32
 gcggccgcgc catggaggtc gtggagagat tc 32

<210> 33
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> künstlich

<220>
 <223> Primer

<400> 33
 gcggccgcgt cactcagttt tagctccc 28

<210> 34
 <211> 903
 <212> DNA
 <213> *Ostreococcus tauri*

<400> 34
 atgagcgctt ccggtgcgct gctgcccgcg atcgcgcttcg ccgctacgc gtacgcgacg 60
 tacgcctacg cctttgagtg gtcgcacgcg aatggcatcg acaacgctga cgcgcgcgag 120
 tggatcggtg cgctgtcgtt gaggctcccc gcgatcgcga cgacgatgta cctggtgttc 180
 tgcttggtcg gaccgaggtt gatggcgaag cgcgaggcgt tcgacccgaa ggggttcatg 240
 ctggcgtaca atgcgtatca gacggcgttc aacgctcgtc tgctcgggat gttcgcgcga 300
 gagatctcgg ggctggggca gcccggtgtg ggggtcaacca tgccgtggag cgatagaaaa 360
 tcgtttaaga tcctcctcgg ggtgtggttg cactacaaca accaatatft ggagctattg 420
 gacactgtgt tcatggttgc gcgcaagaag acgaagcagt tgagcttctt gcacgtttat 480
 catcacgccc tgttgatctg ggcgtgggtg ttggtgtgtc acttgatggc cacgaacgat 540

tgtatcgatg cctacttcgg cgcggcgtgc aactcgttca ttcacatcgt gatgtactcg 600
tattatctca tgtcggcgct cggcattcga tgcccgtgga agcgatacat caccagggct 660
caaatgctcc aattcgtcat tgtcttcgcy cacgccgtgt tctgtctgcy tcagaagcac 720
tgcccgggtca ccccttccttg ggcgcaaagt ttcgtcatga cgaacatgct cgtgctcttc 780
gggaacttct acctcaaggc gtactcgaac aagtcgcygc gcgacggcgc gagttccgty 840
aaaccagccg agaccacgcy cgcgcccagc gtgcygacgca cgcgatctcy aaaaattgac 900
taa 903

<210> 35
<211> 32
<212> DNA
<213> künstlich

<220>
<223> Primer

<400> 35
gcggccgcygc catgagcgc tccggtgcygc tg 32

<210> 36
<211> 23
<212> DNA
<213> künstlich

<220>
<223> Primer

<400> 36
gcggccgcygt tagtcaattt ttc 23

<210> 37
<211> 1560
<212> DNA
<213> Thraustochytrium sp.

<400> 37
atgacggtyc gctacgacga ggagatcccc ttcgagcagg tccgcygcga caacaagccg 60
gatgacgcct ggtgcygcgat ccacgggcac gtgtacgatg tgaccaagt tgcgagcgyt 120
caccggggcy gcgacattat cctgctggcc gcaggcaagg aggccaccgt gctgtacgag 180
acttaccatg tgcggggcgt ctcggacgcy gtgctgcyga agtaccgcat cggcaagctg 240
ccggacggcc aaggcggcgc gaacgagaag gaaaagcgyga cgtctcggg cctctcgytcy 300
gcctcgtact acacgtggaa cagcacttt tacagggtaa tgcgcygagcy cgtcgytggct 360
cggctcaagg agcgcggcaa ggcccgcgc ggaggctacg agctctggat caaggcgytc 420
ctgctgctcy tcygcttctg gagctcgyt tactggatgt gcacgctgga cccctcgytc 480
ggggccatcc tggccgcat gtcgytggc gtctttgccc cctttgtygg cacgtycatc 540
cagcagcagcy gcaaccacgy cgcctttgcc cagtcgygat gggtaacaa ggttgccggg 600
tggacgctcy acatgatcgy cgcagcggc atgacgytgg agttccagca cgtcctgggc 660
caccatccgt acacgaacct gatcgyggag gagaacggcc tgcaaaaaggt gagcggcaag 720

aagatggaca ccaagctggc cgaccaggag agcgatccgg acgtcttttc cacgtaccgg 780
atgatgcgcc tgcacccgtg gcaccagaag cgctggtacc accgtttcca gcacatttac 840
ggccccttca tctttggctt catgaccatc aacaaggtgg tcacgcagga cgtcgggtg 900
gtgctccgca agcggctctt ccagattgac gccgagtgcc ggtacgcgag cccaatgtac 960
gtggcgcggt tctggatcat gaaggcgtc acggtgctct acatggtggc cctgccgtgc 1020
tacatgcagg gcccgtggca cggcctcaag ctgttcgca tcgcgcactt tacgtgcggc 1080
gaggtgctcg caaccatggt cattgtgaac cacatcatcg agggcgtctc gtacgcttcc 1140
aaggacgcgg tcaagggcac gatggcgccg ccgaagacga tgcacggcgt gacgcccacg 1200
aacaacacgc gcaaggaggt ggaggcggag gcgtccaagt ctggcgcctg ggtcaagtca 1260
gtcccgtcgc acgactgggc cgccgtccag tgccagacct cggatgaactg gagcgtcggc 1320
tcgtggttct ggaatcactt ttccggcggc ctcaaccacc agattgagca ccacctgtc 1380
cccgggctca gccacgagac gtactaccac atccaggacg tcgttcagtc cacctgcgcc 1440
gagtacggcg tcccgtacca gcacgagcct tcgctctgga ccgcgtactg gaagatgctc 1500
gagcacctcc gtcagctcgg caatgaggag acccacgagt cctggcagcg cgctgcctga 1560

<210> 38
<211> 32
<212> DNA
<213> künstlich

<220>
<223> Primer

<400> 38
gcggccgcg catgacggtc ggctacgacg ag 32

<210> 39
<211> 29
<212> DNA
<213> künstlich

<220>
<223> Primer

<400> 39
gcggccgcgt caggcagcgc gctgccagg 29

<210> 40
<211> 819
<212> DNA
<213> *Thalassiosira pseudonana*

<400> 40
atggacgcct acaacgctgc tatggacaag attggtgctg ctattattga ctggtctgat 60
cccgatggaa agttccgtgc cgatagagag gactggtggc tctgcgactt ccgtagcgcc 120
atcaccatcg ccctcatcta catgccttc gtcacccctg gttccgccgt catgcaatcc 180
ctccccgcaa tggatcccta ccccatcaaa ttctctaca acgtctccca aatcttcctt 240

tgtgcctaca	tgactgtcga	ggcgggattt	ttggcctacc	gcaatggata	taccgtcatg	300
ccttgcaatc	atttcaatgt	gaatgatcct	cccgtggcga	atcttctttg	gttgttttat	360
atttccaagg	tgtgggactt	ttgggatacc	atthtcattg	tgttggggaa	gaagtggcgt	420
caattatctt	tcttgcattg	ataccatcac	accaccatct	ttctatttcta	ttggctgaat	480
gccaatgtct	tgtacgatgg	tgacatcttc	cttaccatct	tgctcaatgg	attcatccac	540
acggtgatgt	acacgtatta	cttcatctgt	atgcatacca	aagattccaa	gacgggcaag	600
agtcttccta	tatggtggaa	gtcgagtttg	acggcgtttc	agttggtgca	attcactatc	660
atgatgagtc	aggctaccta	ccttgtcttc	cacgggtgtg	ataaggtgtc	gcttcgtatc	720
acgattgtgt	actttgtgta	cattttgagt	ttgttcttcc	tttttgctca	gttctttgtg	780
caatcataca	tggcacccaa	aaagaagaag	agtgcttag			819

<210> 41
 <211> 1371
 <212> DNA
 <213> *Ostreococcus tauri*

<400> 41						
atgtgcgtgg	agacggaaaa	taacgatggg	atccccacgg	tggagatcgc	gttcgacggt	60
gagcgcgagc	gggaggaggc	aaacgtgaag	ctgtccgcgg	agaagatgga	gccggcggcg	120
ctggcgaaga	cgttcgcgag	gcggtacgtc	gtgatcgagg	gggtggagta	cgatgtgacg	180
gattttaagc	acccgggagg	aacggttatt	ttctatgcgt	tgtcaaacac	cggggcggac	240
gcgacggaag	cgttcaagga	gtttcatcat	cggtcgagaa	aggcgaggaa	agccttggcg	300
gcgctcccgt	ctcgaccggc	caagacggcc	aaggtggacg	acgcggagat	gctccaagat	360
ttcgccaagt	ggcggaaaaga	attggagaga	gatggattct	tcaagccctc	tccggcgcac	420
gtggcgtatc	gcttcgccga	gctcgcggcg	atgtacgctc	tcgggacgta	cctgatgtac	480
gctcgatacg	tcgtctcttc	gggtctcgtg	tacgcttgct	ttttcggcgc	ccgatgcggt	540
tgggtgcagc	acgagggcgg	acacagctcg	ctgacgggca	acatttggtg	ggacaagcgc	600
atccaggcct	tcacagccgg	gttcgggtctc	gccggtagcg	gcgacatgtg	gaactc gatg	660
cacaacaagc	atcacgcgac	gcctcaaaaag	gttcgtcacg	acatggatct	ggacaccacc	720
cccgcgggtg	cgttcttcaa	caccgcgggtg	gaagacaatc	gtccccgtgg	ctttagcaag	780
tactggttgc	gccttcaggc	gtggaccttc	atccccgtga	cgctccggctt	ggtgctcctt	840
ttctggatgt	ttttcctcca	cccctccaag	gctttgaagg	gtggcaagta	cgaagagttg	900
gtgtggatgc	tcgccgcgca	cgatcatccgc	acgtggacga	tcaaggcggg	gaccggattc	960
accgcgatgc	agtcctacgg	cttatttttg	gcgacgagct	gggtgagcgg	ctgctatctg	1020
tttgacact	tctccacgtc	gcacacgcac	ctggatgtgg	tgccccgcca	cgagcatctc	1080
tcctgggttc	gatacgcctg	cgatcacacg	atcgacatcg	atccgagtca	aggttgggtg	1140
aactggttga	tgggctacct	caactgcca	gtcatccacc	acctctttcc	gagcatgccg	1200
cagttccgcc	agccccgaggt	atctcgcgcg	ttcgtcgcct	ttgcgaaaaa	gtggaacctc	1260

aactacaagg tcatgacctt cgccgggtgcg tggaaggcaa cgctcggaaa cctcgacaac 1320

gtgggtaagc actactacgt gcacggccaa cactccggaa agacggcgta a 1371

<210> 42
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> künstlich

<220>
 <223> Degenerierter Primer

<220>
 <221> modifizierte Base
 <222> (6)..(6)
 <223> I

<220>
 <221> Gemischtes Merkmal
 <222> (6)..(6)
 <223> n ist a, c, g oder t

<220>
 <221> modifizierte Base
 <222> (12)..(12)
 <223> I

<220>
 <221> Gemischtes Merkmal
 <222> (12)..(12)
 <223> n ist a, c, g oder t

<400> 42
 tgggtnybtg cncaygartg yggghca 26

<210> 43
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> künstlich

<220>
 <223> Degenerierter Primer

<220>
 <221> modifizierte Base
 <222> (3)..(3)
 <223> I

<220>
 <221> Gemischtes Merkmal
 <222> (3)..(3)
 <223> n ist a, c, g oder t

<220>
 <221> modifizierte Base
 <222> (9)..(9)
 <223> I

<220>
 <221> Gemischtes Merkmal
 <222> (9)..(9)
 <223> n ist a, c, g oder t

<220>
 <221> modifizierte Base
 <222> (24)..(24)
 <223> I

<220>
 <221> Gemischtes Merkmal
 <222> (24)..(24)
 <223> n ist a, c, g oder t

<400> 43
 ttnggrtcng trtgytgvar raangt 26

<210> 44
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> künstlich

<220>
 <223> Primer

<400> 44
 atgaagacca tgtcgcgctc catgt 25

<210> 45
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> künstlich

<220>
 <223> Primer

<400> 45
 gacgagcacc tcacccctgct tag 23

<210> 46
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> künstlich

<220>
 <223> Desaturase-Signatur 1

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(48)
 <223> Xaa ist eine beliebige Aminosäure

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(48)
 <223> Xaa ist eine beliebige Aminosäure

<220>
 <221> Gemischtes Merkmal
 <222> (49)..(50)
 <223> Xaa kann jede natürlich vorkommende Aminosäure sein

<400> 46
 Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Xaa Xaa Xaa His
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa
 20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Xaa His
 35 40 45

Xaa Xaa His
 50

<210> 47
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> künstlich

<220>
 <223> Desaturase-Signatur 2

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(15)
 <223> Xaa ist eine beliebige Aminosäure

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa ist Gln oder His

<400> 47

Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

His

<210> 48
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> künstlich

<220>
 <223> Desaturase-Signatur 3

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(13)
 <223> Xaa ist eine beliebige Aminosäure
 <400> 48

His Xaa Xaa His His Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Tyr
 1 5 10

<210> 49
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> künstlich

<220>
 <223> Desaturase-Signatur 4

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(14)
 <223> Xaa ist eine beliebige Aminosäure

<400> 49

His Xaa Xaa His His Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Tyr
 1 5 10

<210> 50
 <211> 1300
 <212> DNA
 <213> *Hyaloperonospora parasitica*

<400> 50
 agtagtgatc ttgtcgccac gcgtcccgca ccaagtctca cgtaacacca tttcgggaact 60
 tgctccgtca gccacaaaaa cgtccatggc gaccaagcaa tcggtcgcgt tcccgaccct 120
 cacggacctc aagcggtcgc tcccaagcga gtgcttcgaa tcttcattgc cgctgtcact 180
 ctactacacg ctgcgctcgc tcgtgtttgc cggttccttg gctgtaagtc tcagctacgc 240
 gctcgcccag ccactcgtcc agaacttcta cccgctccgt gtcgctctaa tcgctgggcta 300
 caccgtgttc cagggcgtga tcttctgggg ctttttcacc atcggtcatg atgccggta 360
 cggcgttttc agccgctacc cggtgctcaa cttcaccgtc gggacgctca tgcactcgt 420
 catcctcacg ccgttcgagt cgtggaaact cacgcaccgc caccaccaca agaacacggg 480
 caacatcgac cgagacgaga tcttttacc ccaacgggag agcgacgacc acccagtttc 540
 tcgccatttg accttcacgc tcggagctgc gtggttcgcc tacctcgtcg aggggtttcc 600
 acctcggaata ctcaatcact ataaccctgt cgagccgctc tttgaacgga gagtatctgc 660
 tgttatcatc tcaattctcg cccagttttt cgtcgcggga ctctcgatct acctctgctt 720
 tcaagtggga gtccaggctg tggcgtctta ttactacgga ccgatcttg tctttggcac 780
 gatgctcgtc atcacgacgt ttttgacca caatgacgag gagacgccgt ggtatggaga 840
 cgaggactgg tcgtacgtca agggcaacct ctcgctcggt gatcggtcac acggaccgct 900
 cattgataac ttgagccaca acattggcac gcaccaggtc catcacctgt tccccattat 960
 tccccactac aagctcaagc ccgcgacagc tgcttttcgt cgtgcttttc ctcacctcgt 1020
 acgcaagagt gacgagcggg ttcttcaggc gttttaccgc atcggtcggc tctatgcaaa 1080
 gtacggcgtc gccgactcgt cagccaagct gtttactctc aaggaagccc aattgacgtc 1140
 gaaagcagca agtgatgcc aagcagctta ggattagcgc tggaagcagt tctcactcat 1200
 gcaagacagg ctcacaaaaa cgaacgatgg acggatggat gtggcaagtg atctattgac 1260
 agatgaacgg tctacgtcac ttctactcta gtctaacgaa 1300

<210> 51
 <211> 1086
 <212> DNA
 <213> *Hyaloperonospora parasitica*

<400> 51
atggcgacca agcaatcggg cgcgttcccc accctcacgg acctcaagcg gtcgctccca 60
agcgagtgct tcgaatcctc attgccgctg tcaactctact acacgctgcg ctcgctcgtg 120
tttgccgggt ccttggctgt aagtctcagc tacgcgctcg cccagccact cgtccagaac 180
ttctacccgc tccgtgtcgc tctaatacgc ggctacaccg tgttccaggg cgtgatcttc 240
tggggctttt tcaccatcgg tcatgatgcc ggtaacggcg ctttcagccg ctacccgggtg 300
ctcaacttca ccgtcgggac gctcatgcac tcgctcatcc tcacgccgtt cgagtcgtgg 360
aaactcacgc accgccacca ccacaagaac acgggcaaca tcgaccgaga cgagatcttt 420
taccaccaac gggagagcga cgaccacca gtttctcgcc atttgacctt cacgctcggg 480
gctgcgtggt tcgcctacct cgtcagagggg tttccacctc ggaaactcaa tcaactataac 540
ccgttcgagc cgctctttga acggagagta tctgctgtta tcatctcaat tctcgcccag 600
tttttcgctg cgggactctc gatctacctc tgctttcaag tgggagtcca ggctgtggcg 660
ctctattact acggaccgat ctttgtcttt ggcacgatgc tcgctcatcac gacgtttttg 720
caccacaatg acgaggagac gccgtggtat ggagacgagg actggtcgta cgtcaagggc 780
aacctctcgt cggttgatcg gtcatacggg ccgctcattg ataacttgag ccacaacatt 840
ggcacgcacc aggtccatca cctgttcccc attattcccc actacaagct caagcccgcg 900
acagctgctt ttcgctcgtc ttttctcac ctcgtacgca agagtgcga gcggattctt 960
caggcgtttt accgcatcgg tcggctctat gcaaagtacg gcgctgccga ctcgctcagcc 1020
aagctgttta cactcaagga agcccaattg acgtcgaag cagcaagtga tgccaaagca 1080
gcttag 1086

<210> 52
<211> 361
<212> PRT
<213> *Hyaloperonospora parasitica*

<400> 52

Met Ala Thr Lys Gln Ser Val Ala Phe Pro Thr Leu Thr Asp Leu Lys
1 5 10 15

Arg Ser Leu Pro Ser Glu Cys Phe Glu Ser Ser Leu Pro Leu Ser Leu
20 25 30

Tyr Tyr Thr Leu Arg Ser Leu Val Phe Ala Gly Ser Leu Ala Val Ser
35 40 45

Leu Ser Tyr Ala Leu Ala Gln Pro Leu Val Gln Asn Phe Tyr Pro Leu
50 55 60

Arg Val Ala Leu Ile Ala Gly Tyr Thr Val Phe Gln Gly Val Ile Phe
65 70 75 80

Trp Gly Phe Phe Thr Ile Gly His Asp Ala Gly His Gly Ala Phe Ser

85

90

95

Arg Tyr Pro Val₁₀₀ Leu Asn Phe Thr Val₁₀₅ Gly Thr Leu Met His₁₁₀ Ser Leu

Ile Leu Thr₁₁₅ Pro Phe Glu Ser Trp₁₂₀ Lys Leu Thr His₁₂₅ Arg His His His

Lys Asn₁₃₀ Thr Gly Asn Ile Asp₁₃₅ Arg Asp Glu Ile Phe₁₄₀ Tyr Pro Gln Arg

Glu Ser Asp Asp His Pro Val Ser Arg His Leu₁₅₅ Thr Phe Thr Leu Gly₁₆₀

Ala Ala Trp Phe Ala₁₆₅ Tyr Leu Val Glu Gly₁₇₀ Phe Pro Pro Arg Lys₁₇₅ Leu

Asn His Tyr Asn₁₈₀ Pro Phe Glu Pro Leu₁₈₅ Phe Glu Arg Arg Val₁₉₀ Ser Ala

Val Ile Ile₁₉₅ Ser Ile Leu Ala Gln Phe Phe Val Ala Gly₂₀₅ Leu Ser Ile

Tyr Leu₂₁₀ Cys Phe Gln Val Gly₂₁₅ Val Gln Ala Val Ala₂₂₀ Leu Tyr Tyr Tyr

Gly Pro Ile Phe Val Phe₂₃₀ Gly Thr Met Leu Val₂₃₅ Ile Thr Thr Phe Leu₂₄₀

His His Asn Asp Glu₂₄₅ Glu Thr Pro Trp Tyr₂₅₀ Gly Asp Glu Asp Trp₂₅₅ Ser

Tyr Val Lys Gly₂₆₀ Asn Leu Ser Ser Val₂₆₅ Asp Arg Ser Tyr Gly₂₇₀ Pro Leu

Ile Asp Asn₂₇₅ Leu Ser His Asn Ile₂₈₀ Gly Thr His Gln Val₂₈₅ His His Leu

Phe Pro₂₉₀ Ile Ile Pro His Tyr₂₉₅ Lys Leu Lys Pro Ala₃₀₀ Thr Ala Ala Phe

Arg Arg Ala Phe Pro His₃₁₀ Leu Val Arg Lys Ser₃₁₅ Asp Glu Arg Ile Leu₃₂₀

Gln Ala Phe Tyr Arg₃₂₅ Ile Gly Arg Leu Tyr₃₃₀ Ala Lys Tyr Gly Val₃₃₅ Ala

Asp Ser Ser Ala₃₄₀ Lys Leu Phe Thr Leu₃₄₅ Lys Glu Ala Gln Leu₃₅₀ Thr Ser

Lys Ala Ala Ser Asp Ala Lys Ala Ala

355

360

<210> 53
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> künstlich

<220>
 <223> Primer

<400> 53
 atggcgacca agcaatcgg 19

<210> 54
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> künstlich

<220>
 <223> Primer

<400> 54
 gcggccgcgc catggcgacc aagcaatcgg 30

<210> 55
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> künstlich

<220>
 <223> Primer

<400> 55
 ctaagctgct ttggcatcac 20

<210> 56
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> künstlich

<220>
 <223> Primer

<400> 56
 gcggccgcgc taagctgctt tggcatcac 29

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Patentliteratur

- WO 91/13972 [0009]
- WO 93/11245 [0009]
- WO 94/11516 [0009]
- EP 0550162 A [0009]
- WO 94/18337 [0009]
- WO 97/30582 [0009]
- WO 97/21340 [0009]
- WO 95/18222 [0009]
- EP 0794250 A [0009]
- WO 93/06712 [0009]
- US 5614393 [0009]
- WO 96/21022 [0009]
- WO 00/21557 [0009]
- WO 99/27111 [0009]
- WO 98/46763 [0009]
- WO 98/46764 [0009]
- WO 98/46765 [0009]
- WO 99/64616 [0009]
- WO 98/46776 [0009]
- DE 10219203 A [0016]
- WO 2005/083053 [0022]
- WO 01/29058 [0042]
- WO 99/32619 [0042]
- US 5565350 [0042]
- US 5756325 [0042]
- US 5871984 [0042]
- US 5731181 [0042]
- US 5795972 [0042]
- US 6573046 [0042]
- US 6211351 [0042]
- US 6586184 [0042]
- US 6271360 [0042]
- US 6479292 [0042]
- WO 2006/100241 [0044]
- WO 2004057001 [0044]
- EP 0388186 A [0051]
- EP 335528 [0051]
- WO 93/21334 [0051]
- EP 249676 [0051]
- US 5608152 [0051, 0052, 0061]
- WO 98/45461 [0051, 0052]
- US 5504200 [0051, 0052, 0061]
- WO 91/13980 [0051, 0052, 0061]
- WO 95/15389 [0051, 0052, 0061]
- WO 95/23230 [0051, 0052, 0061]
- WO 99/16890 [0051, 0051, 0052, 0061]
- US 5315001 [0052]
- WO 92/18634 [0052]
- WO 93120216 [0052]
- US 5677474 [0052]
- US 5530149 [0052]
- EP 571741 [0052]
- JP 06/62870 [0052]
- WO 98/08962 [0052]
- US 5689040 [0052]
- EP 781849 [0052]
- WO 95/19443 [0053, 0060]
- DE 10102337 [0054]
- DE 10102338 [0054]
- WO 98/01572 [0055]
- US 5352605 [0059]
- WO 84/02913 [0059]
- US 4962028 [0059]
- US 5187267 [0060]
- WO 96/12814 [0060]
- EP 0375091 A [0060]
- WO 98145461 [0061]
- WO 95/16783 [0061]
- WO 97/06250 [0061]
- WO 99/46394 [0061]

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Paulos, A Lipids 30: 1–14, 1995 [0003]
- Horrocks, LA und Yeo YK Pharmacol Res 40: 211–225, 1999 [0003]
- Stukey et al., J. Biol. Chem., 265, 1990: 20144–20149 [0009]
- Wade et al., Nature 347, 1990: 200–203 [0009]
- Huang et al., Lipids 34, 1999: 649–659 [0009]
- McKeon et al., Methods in Enzymol. 71, 1981: 12141–12147 [0009]
- Wang et al., Plant Physiol. Biochem., 26, 1988: 777–792 [0009]
- R. Vazhappilly & F. Chen (1998) Botanica Marina 41: 553–558 [0010]
- K. Totani & K. Oba (1987) Lipids 22: 1060–1062 [0010]
- M. Akimoto et al. (1998) Appl. Biochemistry and Biotechnology 73: 269–278 [0010]
- Yu, R. et al. Lipids 35: 1061–1064, 2000 [0011]
- Takeyama, H. et al. Microbiology 143: 2725–2731, 1997 [0011]
- Zank, T. K. et al. Plant Journal 31: 255–268, 2002 [0012]
- Sakuradani, E. et al. Gene 238: 445–453, 1999 [0012]
- Sprecher 2000, Biochim. Biophys. Acta 1486: 219–231 [0012]

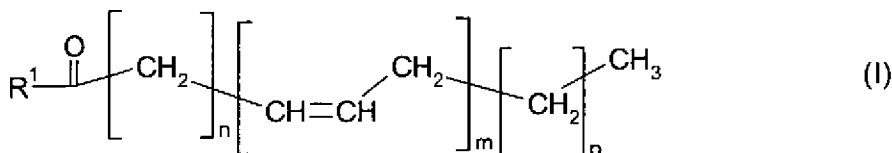
- Tocher et al. 1998, *Prog. Lipid Res.* 37, 73–117 [0013]
- Domergue et al. 2002, *Eur. J. Biochem.* 269, 4105–4113 [0013]
- Shimikawa 2001, *World Rev. Nutr. Diet.* 88, 100–108 [0014]
- Calder 2002, *Proc. Nutr. Soc.* 61, 345–358 [0014]
- Cleland und James 2000, *J. Rheumatot.* 27, 2305–2307 [0014]
- E. Ucciani: *Nouveau Dictionnaire des Huiles Végétales* [Neues Wörterbuch der Pflanzenöle]. *Technique & Documentation Lavoisier*, 1995. ISBN: 2-7430-0009-0 [0015]
- Zank, T. K. et al. *Plant Journal* 31: 255–268, 2002 [0015]
- Beaudoin et al. *Biochem Soc Trans* 28: 661–663, 2000 [0015]
- *Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1–6.3.6 [0035]
- Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989 [0035]
- Hames und Higgins (Hrsg.) 1985 [0035]
- "Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (Hrsg.) 1991, "Essential Molecular Biology: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford [0035]
- *J. Mol. Evolution.*, 25, 351–360, 1987 [0036]
- Higgins et al., *CABIOS*, 5 1989: 151–153 [0036]
- *J. Mol. Biol.* 48: 443–453 (1970) [0036]
- *Adv. Appl. Math.* 2: 482–489 (1981) [0036]
- Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711, 1991 [0036]
- Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. Ausg., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989 [0040]
- Chirgwin et al. (1979) *Biochemistry* 18: 5294–5299 [0040]
- Fire et al., *Nature* (1998) 391: 806–811 [0042]
- Fire, *Trends Genet.* 15, 358–363 (1999) [0042]
- Sharp, *RNA interference* 2001. *Genes Dev.* 15, 485–490 (2001) [0042]
- Hammond et al. *Nature Rev. Genet.* 2, 1110–1119 (2001) [0042]
- Tuschl, *Chem. Biochem.* 2, 239–245 (2001) [0042]
- Hamilton et al., *Science* 286, 950–952 (1999) [0042]
- Hammond et al., *Nature* 404, 293–296 (2000) [0042]
- Zamore et al., *Cell* 101, 25–33 (2000) [0042]
- Bernstein et al., *Nature* 409, 363–366 (2001) [0042]
- Elbashir et al., *Genes Dev.* 15, 188–200 (2001) [0042]
- Elbashir et al., 2001 *Nature* 411: 494–498 [0042]
- Sambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Ausg., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989 [0048]
- *Methods in Molecular Biology*, 1995, Bd. 44, *Agrobacterium protocols*, Hrsg.: Gartland und Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey [0048]
- Hellens et al, *Trends in Plant Science* (2000) 5, 446–451 [0049]
- *Plant Molecular Biology and Biotechnology* (CRC Press, Boca Raton, Florida), Kapitel 6/7, S. 71–119 (1993) [0049]
- F. F. White, *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants*; in: *Transgenic Plants*, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsg.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, 15–38 [0049]
- B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, in: *Transgenic Plants*, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsg.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128–143 [0049]
- Potrykus, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991), 205–225 [0049]
- Goeddel: *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) [0050]
- Gruber und Crosby, in: *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, Florida, Hrsg.: Glick und Thompson, Kapitel 7, 89–108 [0050]
- Franck et al., *Cell* 21 (1980) 285–294 [0051]
- Ward et al., *Plant. Mol. Biol.* 22 (1993) [0051]
- *Plant J.* 2, 1992: 397–404 (Gatz et al., *Tetracyclininduzierbar*) [0051]
- Stockhaus et al., *EMBO J.* 8, 1989, 2445 [0051]
- Baumlein et al., *Plant J.*, 2, 2, 1992: 233–239 [0051]
- Baumlein et al., *Mol. Gen Genet.*, 1991, 225 (3) [0052]
- Baumlein et al., *Plant J.*, 2, 2, 1992 [0052]
- Gatz 1997, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48: 89–108 [0053]
- Gatz et al. (1992) *Plant J.* 2, 397–404 [0053]
- Romanas, M. A., et al. (1992) "Foreign gene expression in yeast: a review", *Yeast* 8: 423–488 [0055]
- van den Handel, C.A.M.J.J., et al. (1991) "Heterologous gene expression in filamentous fungi", in: *More Gene Manipulations in Fungi*, J. W. Renne & L. L. Lasure, Hrsg., S. 396–428: Academic Press: San Diego [0055]
- 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., Hrsg., S. 1–28, Cambridge University Press: Cambridge [0055]
- Falciatore et al., 1999, Marine Biotechnology 1, 3: 239–251 [0055]
 - Schmidt, R. und Willmitzer, L. (1988) "High efficiency Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation von Arabidopsis thaliana leaf and cotyledon explants" Plant Cell Rep.: 583–586 [0055]
 - Plant Molecular Biology and Biotechnology, C Press, Boca Raton, Florida, Kapitel 6/7, S. 71–119 (1993) [0055]
 - F. F. White, B. Jené et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsg.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128–43 [0055]
 - Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205–225 [0055]
 - Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) [0055]
 - Pharmacia Biotech Inc; Smith, D. B., und Johnson, K. S. (1988) Gene 67: 31–40 [0056]
 - Amann et al. (1988) Gene 69: 301–315 [0056]
 - Studier et al., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 60–89 [0056]
 - Baldari et al. (1987) Embo J. 6: 229–234 [0057]
 - Kurjan und Herskowitz (1982) Cell 30: 933–943 [0057]
 - Schultz et al. (1987) Gene 54: 113–123 [0057]
 - 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., Hrsg., S. 1–28, Cambridge University Press: Cambridge [0057]
 - More Gene Manipulations in Fungi (J. W. Gennett & L. L. Lasure, Hrsg., S. 396–428: Academic Press: San Diego [0057]
 - Smith et al. (1983) Mol. Cell Biol. 3: 2156–2165 [0058]
 - Lucklow und Summers (1989) Virology 170: 31–39 [0058]
 - 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 [0059]
 - Bevan, M. W. (1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", Nucl. Acids Res. 12: 8711–8721 [0059]
 - Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsg.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15–38 [0059]
 - Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835 ff. [0059]
 - Gallie et al., 1987, Nucl. Acids Research 15: 8693–8711 [0059]
 - Benfey et al., EMBO J. 8 (1989) 2195–2202 [0059]
 - Franck et al., Cell 21 (1980) 285–294 [0059]
 - Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996) 285–423 [0059]
 - Gatz 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48: 89–108 [0060]
 - Gatz et al. (1992) Plant J. 2, 397–404 [0060]
 - Ward et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993) 361–366 [0060]
 - Baeumlein et al., Mol. Gen. Genet., 1991, 225 (3): 459–67 [0061]
 - LeB4; Baeumlein et al., 1992, Plant Journal, 2 (2): 233–9 [0061]
 - Hrsg. Pouwels, P. H., et al., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018 [0062]
 - Kapiteln 16 und 17 von Sambrook, J., Fritsch, E. F., und Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Ausg., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 [0062]
 - Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) [0069]
 - Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 119–128 [0069]
 - Harlow und Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988, oder Köhler und Milstein, Nature 256 (1975), 495 [0077]
 - Golfre, Meth. Enzymol. 73 (1981), 3 [0077]
 - Mikoklajczak et al., Journal of the American Oil Chemical Society, 38, 1961, 678–681 [0102]
 - Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991 [0126]
 - Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994 [0126]
 - "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D. C., USA, 1981) [0127]
 - Medien lassen sich in dem Lehrbuch "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach" (Herausgeber P. M. Rhodes, P. F. Stanbury, IRL Press (1997) S. 53–73, ISBN 0 19 963577 3 [0135]
 - F. C. Neidhardt et al. (1996) E. coli und Salmonella. ASM Press: Washington, D. C., S. 612–636 [0144]
 - Lengeler et al. (Hrsg.) (1999) Biology of Prokaryotes. Thieme: Stuttgart, New York [0144]
 - sowie Magnuson, K., et al. (1993) Microbiological Reviews 57: 522–542 [0144]

- Frentzen, 1998, Lipid, 100 (4–5): 161–166 [0148]
- Kinney, 1997, Genetic Engineering, Hrsg.: JK Setlow, 19: 149–166 [0149]
- Ohlrogge und Browse, 1995, Plant Cell 7: 957–970 [0149]
- Shanklin und Cahoon, 1998, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49: 611–641 [0149]
- Voelker, 1996, Genetic Engineering, Hrsg.: JK Setlow, 18: 111–13 [0149]
- Gerhardt, 1992, Prog. Lipid R. 31: 397–417 [0149]
- Gühnemann-Schäfer & Kindl, 1995, Biochim. Biophys Acta 1256: 181–186 [0149]
- Kursau et al., 1995, Prog. Lipid Res. 34: 267–342 [0149]
- Stymne et al., 1993, in: Biochemistry and Molecular Biology of Membrane and Storage Lipids of Plants, Hrsg.: Murata und Somerville, Rockville, American Society of Plant Physiologists, 150–158, Murphy & Ross 1998, Plant Journal. 13 (1): 1–16 [0149]
- Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) [0160]
- Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463–5467 [0161]
- Ullman, Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 89–90 und S. 443–613, VCH: Weinheim (1985) [0162]
- Fallon, A., et al., (1987) "Applications of HPLC in Biochemistry" in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17 [0162]
- Rehm et al. (1993) Biotechnology, Bd. 3, Kapitel III: "Product recovery and purification", S. 469–714, VCH: Weinheim [0162]
- Better, P. A., et al. (1988) Bioseparations: downstream processing for Biotechnology, John Wiley and Sons [0162]
- Kennedy, J. F., und Cabral, J. M. S. (1992) Recovery processes for biological materials, John Wiley and Sons [0162]
- 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 [0162]
- Dechow, F. J. (1989) Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications [0162]
- Cahoon et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (22): 12935–12940 [0163]
- Browse et al. (1986) Analytic Biochemistry 152: 141–145 [0163]
- Christie, William W., Advances in Lipid Methodology, Ayr/Scotland: Oily Press (Oily Press Lipid Library; 2) [0163]
- 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) [0163]
- "Progress in Lipid Research", Oxford: Pergamon Press, 1 (1952)–16 (1977) unter dem Titel: Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids CODEN [0163]
- Applied Microbial Physiology; A Practical Approach, P. M. Rhodes und P. F. Stanbury, Hrsg., IRL Press, S. 103–129; 131–163 und 165–192 (ISBN: 0199635773) [0164]
- 1997, in: Advances on Lipid Methodology, Vierte Ausgabe: Christie, Oily Press, Dundee, 119–169 [0166]
- 1998, Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Verfahren [gas chromatography/mass spectrometry methods], Lipide 33: 343–353 [0166]
- Sayanova O et al. J. Biol. Chem., 2006, 281, 36533–36541 [0170]
- Thompson JD, et al., Nucleic Acids Res., 1994, 22: 4673–4680 [0170]
- Napier und Michaelson, 2001, Lipids. 36(8): 761–766 [0176]
- Sayanova et al., 2001, Journal of Experimental Botany. 52(360): 1581–1585 [0176]
- Sperling et al., 2001, Arch. Biochem. Biophys. 388(2):293–298 [0176]
- Michaelson et al., 1998, FERS Letters. 439(3) : 215–218 [0176]
- 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 [0184]
- De Greve, H., Dhaese, P., Seurinck, J., Lemmers, M., Van Montagu, M. und 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) [0184]
- Deblaere et al, 1984, Nucl. Acids. Res. 13, 4777–4788 [0186]
- Murashige und Skoog 1962 Physiol. Plant. 15, 473 [0186]
- Qiu et al. 2001, J. Biol. Chem. 276, 31561–31566 [0187]
- Bell et al., 1999, In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant. 35(6): 456–465 [0188]
- Mlynarova et al. (1994), Plant Cell Report 13: 282–285 [0188]

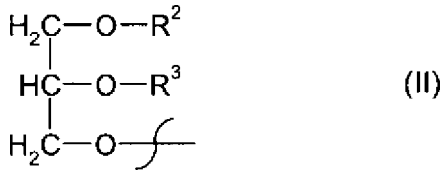
Patentansprüche

1. Polynukleotid, umfassend eine Nukleinsäuresequenz, die aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus:
 - (a) Nukleinsäuresequenz, wie in SEQ ID Nr. 1, 2, 8, 9, 15, 16, 50 und 51 gezeigt;
 - (b) Nukleinsäuresequenz, die ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz umfasst, wie in einer der SEQ ID Nr. 3, 10, 17 und 52 dargestellt;
 - (c) Nukleinsäuresequenz die mindestens 70% Identität mit einer der Nukleinsäuresequenzen unter (a) oder (b) aufweist und die ein Polypeptid mit einer Desaturase-Aktivität kodiert; und
 - (d) Nukleinsäuresequenz für ein Fragment einer Nukleinsäure unter (a), (b) oder (c), wobei das Fragment für ein Polypeptid mit einer Desaturase-Aktivität kodiert.
2. Polynukleotid nach Anspruch 1, wobei das Polynukleotid aus RNA oder DNA besteht.
3. Vektor, der das Polynukleotid nach Anspruch 1 oder 2 umfasst.
4. Vektor nach Anspruch 3, wobei der Vektor ein Expressionsvektor ist.
5. Vektor nach Anspruch 3 oder 4, wobei der Vektor mindestens ein weiteres Polynukleotid umfasst, das ein weiteres Enzym kodiert, das an der Biosynthese von Lipiden oder Fettsäuren beteiligt ist.
6. Wirtszelle, die das Polynukleotid nach Anspruch 1 oder 2 oder den Vektor nach einem der Ansprüche 3 bis 5 umfasst.
7. Wirtszelle nach Anspruch 6, wobei die Wirtszelle mindestens ein weiteres Enzym umfasst, das an der Biosynthese von Lipiden oder Fettsäuren beteiligt ist.
8. Vektor nach Anspruch 5 oder Wirtszelle nach Anspruch 7, wobei das Enzym aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus: Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP-[= Acylcarrierprotein-]Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäureacyltransferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäuresynthase(n), Fettsäurehydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäuredesaturase(n), Fettsäureacetylenase(n), Lipoxygenase(n), Triacylglycerinlipase(n), Allenoxidsynthase(n), Hydroperoxidlyase(n), Fettsäureelongase(n), Δ 4-Desaturase(n), Δ 5-Desaturase(n), Δ 6-Desaturase(n), Δ 8-Desaturase(n), Δ 9-Desaturase(n), Δ 12-Desaturase(n), Δ 5-Elongase(n), Δ 6-Elongase(n) und Δ 9-Elongase(n).
9. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids mit Desaturase- oder Elongase-Aktivität, das folgende Schritte umfasst:
 - (a) das Exprimieren eines Polynukleotids nach Anspruch 1 oder 2 in einer Wirtszelle und
 - (b) Erhalten des Polypeptids, das von dem Polynukleotid unter (a) kodiert wird, aus der Wirtszelle.
10. Polypeptid, das von dem Polynukleotid nach Anspruch 1 oder 2 kodiert wird oder das durch das Verfahren nach Anspruch 9 erhältlich ist.
11. Antikörper, der spezifisch das Polypeptid nach Anspruch 10 erkennt.
12. Transgener, nicht-menschlicher Organismus, der das Polynukleotid nach Anspruch 1 oder 2, den Vektor nach einem der Ansprüche 3 bis 5 oder die Wirtszelle nach Anspruch 6 oder 7 umfasst.
13. Transgener, nicht-menschlicher Organismus nach Anspruch 12, wobei der Organismus ein Tier, eine Pflanze oder ein multizellulärer Mikroorganismus ist.
14. Verfahren zur Herstellung einer Substanz, die die hier nachstehend in der allgemeinen Formel 1 gezeigte Struktur aufweist:

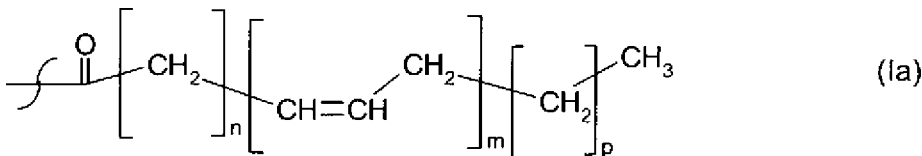


wobei die Variablen und Substituenten Folgende sind:

R¹ = Hydroxyl, Coenzym A (Thioester), Lysophosphatidylcholin, Lysophosphatidylethanolamin, Lysophosphatidylglycerin, Lysodiphosphatidylglycerin, Lysophosphatidylserin, Lysophosphatidylinositol, Sphingobase oder ein Rest der Formel II



R² = Wasserstoff, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerin, Diphosphatidylglycerin, Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol oder ein gesättigtes oder ungesättigtes C₂- bis C₂₄-Alkylcarbonyl, R³ = Wasserstoff, ein gesättigtes oder ungesättigtes C₂- bis C₂₄-Alkylcarbonyl oder R² und R³ sind unabhängig voneinander ein Rest der Formel Ia:



in der

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

und

wobei das Verfahren die Züchtung (i) einer Wirtszelle nach einem der Ansprüche 3 bis 5 oder (ii) eines transgenen, nicht-menschlichen Organismus nach Anspruch 12 oder 13 unter Bedingungen umfasst, die die Biosynthese der Substanz gestatten.

15. Verfahren zur Herstellung einer Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung, umfassend die Schritte des Verfahrens nach Anspruch 14 und den weiteren Schritt der Formulierung der Substanz als eine Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung weiterhin derart formuliert wird, dass ein Arzneimittel, ein Kosmetikprodukt, ein Nahrungsmittel, ein Futtermittel, vorzugsweise Fischfutter, oder eine Nahrungsmittelergänzung erhalten wird.

17. Verwendung des Polynukleotids nach Anspruch 1 oder 2, des Vektors nach einem der Ansprüche 3 bis 5, der Wirtszelle nach Anspruch 6 oder 7, des Vektors oder der Wirtszelle nach Anspruch 8, des Polypeptids nach Anspruch 10 oder des transgenen, nicht-menschlichen Organismus nach Anspruch 12 oder 13 zur Herstellung einer Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung.

18. Verwendung nach Anspruch 17, wobei die Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung als Arzneimittel, Kosmetikprodukt, Nahrungsmittel, Futtermittel, vorzugsweise Fischfutter, oder Nahrungsmittelergänzung eingesetzt wird.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen