



(10) **DE 11 2011 103 527 T5** 2013.10.17

(12)

## Veröffentlichung

der internationalen Anmeldung mit der  
(87) Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2012/052468**  
in deutscher Übersetzung (Art. III § 8 Abs. 2 IntPatÜG)  
(21) Deutsches Aktenzeichen: **11 2011 103 527.6**  
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP2011/068237**  
(86) PCT-Anmeldetag: **19.10.2011**  
(87) PCT-Veröffentlichungstag: **26.04.2012**  
(43) Veröffentlichungstag der PCT Anmeldung  
in deutscher Übersetzung: **17.10.2013**

(51) Int Cl.: **C12N 9/02 (2013.01)**  
**C12N 15/82 (2013.01)**  
**C12P 7/64 (2013.01)**

(30) Unionspriorität:

|                   |                   |           |
|-------------------|-------------------|-----------|
| <b>61/405,255</b> | <b>21.10.2010</b> | <b>US</b> |
| <b>10188419.5</b> | <b>21.10.2010</b> | <b>EP</b> |
| <b>61/431,456</b> | <b>11.01.2011</b> | <b>US</b> |
| <b>11150545.9</b> | <b>11.01.2011</b> | <b>EP</b> |

(71) Anmelder:

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

(74) Vertreter:

**Herzog Fiesser & Partner, 68167, Mannheim, DE**

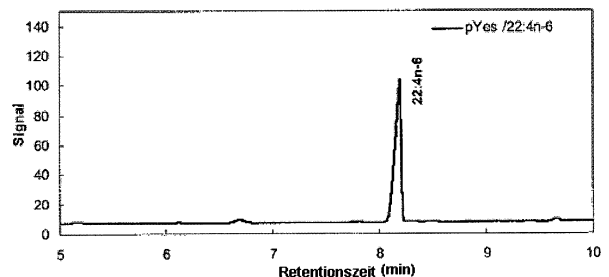
(72) Erfinder:

**Senger, Toralf, 69126, Heidelberg, DE; Bauer,  
Jörg, Durham, N.C., US; Marty, Laurent, 69124,  
Heidelberg, DE**

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Neue Fettsäure-Desaturasen, -Elongasen, -Elongations-Komponenten und Anwendungen davon**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung stellt isolierte Nukleinsäuremoleküle bereit, welche eine neue Fettsäure-Desaturase, -KCS, -KCR, -DH, oder -ECR von *Nannochloropsis oculata* codieren. Die Erfindung stellt ebenfalls rekombinante Expressionsvektoren, die Desaturase-, KCS-, KCR-, DH-, oder ECR-Nukleinsäuremoleküle enthalten, Wirtszellen, in welche die Expressionsvektoren eingebracht worden sind, und Verfahren zur großtechnischen Herstellung von langkettigen mehrfach-ungesättigten Fettsäuren (LCPUFAs), z. B. ARA, EPA und DHA, bereit.



## Beschreibung

**[0001]** Die Erfindung betrifft im Prinzip das Gebiet der rekombinanten Herstellung von Fettsäuren. Sie stellt Nukleinsäuremoleküle bereit, welche Desaturasen, Elongasen und Elongase-Komponenten codieren. Die Erfindung stellt ebenfalls rekombinante Expressionsvektoren, die Desaturase, KCS, KCR, DH, ECR-Nukleinsäuremoleküle enthalten, Wirtszellen, in welche die Expressionsvektoren eingebracht worden sind, und Verfahren zur großtechnischen Herstellung von langkettigen mehrfach-ungesättigten Fettsäuren (LCPUFAs), z. B. ARA, EPA und DHA, bereit.

**[0002]** Fettsäuren sind Carbonsäuren mit langkettigen Kohlenwasserstoff-Seitengruppen, welche eine grundlegende Rolle in zahlreichen biologischen Prozessen spielen. Fettsäuren werden selten frei in der Natur gefunden, sondern treten vielmehr in veresterter Form als die Hauptkomponente von Lipiden auf. Als solches sind Lipide/Fettsäuren Energiequellen (z. B.  $\beta$ -Oxidation). Darüber hinaus sind Lipide/Fettsäuren ein integraler Teil von Zellmembranen und sind deshalb für die Verarbeitung von biologischer oder biochemischer Information unverzichtbar.

**[0003]** Fettsäuren können in zwei Gruppen eingeteilt werden: gesättigte Fettsäuren, gebildet aus Einzel-Kohlenstoffbindungen, und die ungesättigte Fettsäuren, welche eine oder mehrere Kohlenstoffdoppelbindungen in cis-Konfiguration enthalten. Ungesättigte Fettsäuren werden durch terminale Desaturasen erzeugt, welche der Klasse der Nicht-Häm-Eisenenzyme angehören. Sämtliche dieser Enzyme sind Teil eines Elektronen-Transportsystems, welches zwei weitere Proteine enthält, nämlich Cytochrom  $b_5$  und NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase. Im Genauen katalysieren solche Enzyme die Bildung von Doppelbindungen zwischen den Kohlenstoffatomen eines Fettsäuremoleküls, zum Beispiel, durch Katalysieren der Sauerstoff-abhängigen Dehydrierung von Fettsäuren (Sperling et al., 2003). Menschen und andere Säuger besitzen ein begrenztes Spektrum an Desaturasen, welche für die Bildung von bestimmten Doppelbindungen in ungesättigten Fettsäuren erforderlich sind, und weisen daher ein beschränktes Vermögen zum Synthetisieren von essentiellen Fettsäuren, z. B. langkettigen mehrfach-ungesättigten Fettsäuren (LCPUFAs), auf. Somit müssen Menschen gewisse Fettsäuren über ihre Nahrung aufnehmen. Derartige essentielle Fettsäuren schließen zum Beispiel Linolsäure (C18:2) und Linolensäure (C18:3) ein. Im Gegensatz dazu sind Insekten, Mikroorganismen und Pflanzen in der Lage, eine wesentlich größere Vielfalt an ungesättigten Fettsäuren und deren Derivative zu synthetisieren. Tatsächlich ist die Biosynthese von Fettsäuren eine Hauptaktivität von Pflanzen und Mikroorganismen.

**[0004]** Langkettige mehrfach-ungesättigte Fettsäuren (LCPUFAs), wie Docosahexaensäure (DHA, 22:6(4, 7, 10, 13, 16, 19)) sind essentielle Komponenten von Zellmembranen von verschiedenen Geweben und Organellen in Säugern (Nerven, Retina, Hirn und Immunzellen). Zum Beispiel sind über 30% der Fettsäuren in Hirn-Phospholipid 22:6 (n-3) und 20:4 (n-6) (Crawford, M. A., et al., (1997) Am. J. Clin. Nutr. 66:1032S-1041S). In der Retina macht DHA mehr als 60% der gesamten Fettsäuren im Stäbchen-Außensegment, dem lichtempfindlichen Teil der Photorezeptor-Zelle, aus (Giusto, N. M., et al. (2000) Prog. Lipid Res. 39:315–391). Klinische Studien haben gezeigt, dass DHA für das Wachstum und die Entwicklung des Gehirns bei Kleinkindern und für die Beibehaltung der normalen Hirnfunktion bei Erwachsenen wesentlich ist (Martinetz, M. (1992) J. Pediatr. 120:S129–S138). DHA besitzt auch signifikante Auswirkungen auf die Photorezeptorfunktion, die an dem Signaltransduktions-Prozess, an der Rhodopsinaktivierung und an der Entwicklung von Stäbchen und Zäpfchen beteiligt sind (Giusto, N. M., et al. (2000) Prog. Lipid Res. 39:315–391). Darüber hinaus wurden auch einige positive Effekte von DHA gegenüber Erkrankungen, wie Bluthochdruck, Arthritis, Atherosklerose, Depression, Thrombose und Krebserkrankungen, gefunden (Horrocks, L. A. und Yeo, Y. K. (1999) Pharmacol. Res. 40: 211–215). Deshalb ist eine angemessene nahrungsgebundene Zufuhr der Fettsäure für die Gesundheit des Menschen bedeutsam. Weil solche Fettsäuren nicht effizient von Kleinkindern, jungen Kindern und älteren Menschen synthetisiert werden können, ist es besonders wichtig für diese Individuen, diese Fettsäuren angemessen mit der Nahrung aufzunehmen (Spector, A. A. (1999) Lipids 34:S1–S3).

**[0005]** Gegenwärtig sind die Hauptquellen von DHA Öle aus Fisch und Algen. Fischöl ist eine hauptsächliche und traditionelle Quelle für diese Fettsäure, wobei es jedoch zum Verkaufszeitpunkt in der Regel oxidiert ist. Darüber hinaus ist das Angebot an Fischöl in hohem Maße variabel, insbesondere in Hinsicht auf die schrumpfenden Fischpopulationen. Darüber hinaus ist die Algenquelle für Öl wegen des niedrigen Ertrags und den hohen Kosten der Extraktion kostspielig.

**[0006]** Sowohl EPA als auch ARA sind delta ( $\delta$ )5-essentielle Fettsäuren. Sie bilden eine einzigartige Klasse von Nahrungs- und Futtermittelbestandteilen für Menschen und Tiere. EPA gehört zur n-3-Serie mit fünf Doppelbindungen in der Acylkette. EPA wird in Nahrungsmitteln aus dem Meer gefunden und kommt in öligem Fisch aus dem Nordatlantik reichlich vor. ARA gehört zur n-6-Serie mit vier Doppelbindungen. Das Fehlen

einer Doppelbindung in der  $\omega$ -3-Position verleiht ARA andere Eigenschaften als jene, die in EPA gefunden werden. Die aus ARA produzierten Eicosanoide weisen starke entzündliche und Blutplättchen-aggregierende Eigenschaften auf, wohingegen jene, die aus EPA abgeleitet sind, entzündungshemmende und gegen die Blutplättchen-Aggregation gerichtete Eigenschaften aufweisen. ARA kann aus manchen Nahrungsmitteln, wie Fleisch, Fisch und Eiern, aufgenommen werden, aber die Konzentration ist niedrig.

**[0007]** Gamma-Linolensäure (GLA) ist eine weitere, in Säugern vorgefundene essentielle Fettsäure. GLA ist die metabolische Zwischenstufe für sehr langkettige n-6-Fettsäuren und für diverse aktive Moleküle. In Menschen ist die Geschwindigkeit der Bildung von langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren durch die  $\Delta$ 6-Entsättigung beschränkt. Es wurde nachgewiesen, dass zahlreiche physiologische und pathologische Zustände, wie Altern, Stress, Diabetes, Ekzem und manche Infektionen, den  $\Delta$ 6-Entsättigungsschritt senken bzw. unterdrücken. Darüber hinaus wird GLA leicht durch die Oxidation und rasche Zellteilung katabolisiert, welche mit bestimmten Erkrankungen, z. B. Krebs oder Entzündung, einhergehen. Deswegen kann eine Nahrungsergänzung mit GLA die Gefahren dieser Krankheiten verringern. Klinische Studien haben gezeigt, dass die Nahrungsergänzung mit GLA zur Behandlung einiger pathologischer Zustände, wie etwa atopischem Ekzem, prämenstruellem Syndrom, Diabetes, Hypercholesterinämie und entzündlichen sowie kardiovaskulären Krankheiten, wirksam ist.

**[0008]** Obwohl die Biotechnologie einen attraktiven Weg zur Herstellung von speziellen Fettsäuren bietet, versagen derzeitige Techniken darin, einen effizienten Weg für die großtechnische Herstellung von ungesättigten Fettsäuren zur Verfügung zu stellen. Dementsprechend besteht ein Bedarf an einem verbesserten und effizienten Verfahren zur Herstellung ungesättigter Fettsäuren, wie DHA, EPA und ARA.

**[0009]** Somit betrifft die vorliegende Erfindung ein Polynukleotid, das eine Nukleinsäuresequenz umfasst, gewählt aus der Gruppe, bestehend aus:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit einer Nukleotidsequenz, wie in SEQ ID NRn: 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 46, 49, 52, 55, 58, 61 oder 128 gezeigt;
- b) einer Nukleinsäuresequenz, codierend ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID NRn: 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62 oder 129 gezeigt;
- c) einer Nukleinsäuresequenz, die mindestens 70% identisch zur Nukleinsäuresequenz von a) oder b) ist, wobei die Nukleinsäuresequenz ein Polypeptid mit Desaturase-, Keto-Acyl-CoA-Synthase(KCS)-, Keto-Acyl-CoA-Reduktase(KCR)-, Dehydratase(DH) oder Enoyl-CoA-Reduktase(ECR)-Aktivität codiert;
- d) einer Nukleinsäuresequenz, die ein Polypeptid mit Desaturase-, Keto-Acyl-CoA-Synthase(KCS)-, Keto-Acyl-CoA-Reduktase(KCR)-, Dehydratase(DH)- oder Enoyl-CoA-Reduktase(ECR)-Aktivität codiert und eine Aminosäuresequenz aufweist, welche mindestens 70% identisch zur Aminosäuresequenz von einem beliebigen von a) bis c) ist; und
- e) einer Nukleinsäuresequenz, die unter stringenten Bedingungen zum Hybridisieren an ein beliebiges von a) bis d) in der Lage ist, wobei die Nukleinsäuresequenz ein Polypeptid mit Desaturase-, Keto-Acyl-CoA-Synthase(KCS)-, Keto-Acyl-CoA-Reduktase(KCR)-, Dehydratase(DH)- oder Enoyl-CoA-Reduktase(ECR)-Aktivität codiert.

**[0010]** Der Begriff "Polynukleotid", wie gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet, betrifft ein Polynukleotid, das eine Nukleinsäuresequenz umfasst, welche ein Polypeptid mit Desaturase-, Keto-Acyl-CoA-Synthase-, Keto-Acyl-CoA-Reduktase-Dehydratase und Enoyl-CoA-Reduktase-Aktivität codiert. Vorzugsweise soll das von dem Polynukleotid der vorliegenden Erfindung codierte Polypeptid mit Desaturase-, KCS-, KCR-, DH- oder ECR-Aktivität nach der Expression in einer Pflanze zur Erhöhung der Menge an PUFA und insbesondere LCPUFA, z. B. in Samenölen oder der ganzen Pflanze oder Teilen davon, in der Lage sein. Eine derartige Erhöhung ist vorzugsweise statistisch signifikant, wenn mit einer LCPUFA-produzierenden transgenen Kontrollpflanze verglichen wird, die den zur LCPUFA-Synthese erforderlichen minimalen Satz an Desaturasen und Elongasen exprimiert, aber nicht das Polynukleotid der vorliegenden Erfindung exprimiert. Ob eine Erhöhung signifikant ist, kann durch im Fachgebiet allgemein bekannte statistische Tests bestimmt werden, einschließlich z. B. dem t-Test nach Student. Weiter bevorzugt ist die Erhöhung eine Erhöhung der Menge von LCPUFA-enthaltenden Triglyceriden um mindestens 5%, mindestens 10%, mindestens 15%, mindestens 20% oder mindestens 30% im Vergleich zu der Kontrolle. Vorzugsweise ist das oben genannte LCPUFA eine mehrfach ungesättigte Fettsäure mit einem C-20-, C-22- oder C-24-Fettsäurekörper, weiter bevorzugt ARA, EPA oder DHA. Geeignete Testverfahren zur Messung der oben genannten Aktivitäten sind in den begleitenden Beispielen beschrieben.

**[0011]** Der Begriff „Desaturase“ umfasst alle enzymatischen Aktivitäten und Enzyme, die die Entsättigung von Fettsäuren mit verschiedenen Längen und Anzahlen an ungesättigten Kohlenstoffatom-Doppelbindungen ka-

talisieren. Speziell schließt dies delta-4-(d4)-Desaturase, die die Dehydrierung des 4. und 5. Kohlenstoffatoms katalysiert, ein. Delta-5-(d5)-Desaturase katalysiert die Dehydrierung des 5. und 6. Kohlenstoffatoms. Delta-6-(d6)-Desaturase katalysiert die Dehydrierung des 6. und 7. Kohlenstoffatoms. Delta-8-(d8)-Desaturase katalysiert die Dehydrierung des 8. und 9. Kohlenstoffatoms. Delta-9-(d9)-Desaturase katalysiert die Dehydrierung des 9. und 10. Kohlenstoffatoms. Delta-12-(d12)-Desaturase katalysiert die Dehydrierung des 12. und 13. Kohlenstoffatoms. Delta-15-(d15)-Desaturase katalysiert die Dehydrierung des 15. und 16. Kohlenstoffatoms

**[0012]** Die Begriffe „Elongase“ und „Delta x Elo (dxElo)“ sind synonym mit KCS und beziehen sich auf eine enzymatische Keto-Acyl-CoA-Synthaseaktivität, die es erlaubt, zwei Kohlenstoffatome in eine Fettsäure einzuführen, wodurch die Fettsäure verlängert wird. Speziell katalysiert dxElo(No) die Einführung von zwei Kohlenstoffatomen in Fettsäuren mit 18 Kohlenstoffatomen und Doppelbindungen in den Positionen 5, 6, 9, 12 und/oder 15.

**[0013]** Der Begriff „KCR“ bezieht sich, so wie er hier verwendet wird, auf eine Keto-Acyl-CoA-Reduktaseaktivität, welche die Ketogruppe von Keto-Acyl-CoA bei dem Vorgang der Fettsäureverlängerung zu einer Hydroxylgruppe reduziert.

**[0014]** Der Ausdruck „DH“ bezieht sich, so wie er hier verwendet wird, auf eine Dehydrataseaktivität, die die Hydroxylgruppe entfernt, was während der Fettsäureverlängerung zur Bildung eines Acyl-2-en-CoA-Esters (delta-2-Enoyl-CoA) und H<sub>2</sub>O führt.

**[0015]** Der Begriff „ECR“, wie hierin verwendet, bezieht sich auf Enoyl-CoA-Reduktase-Aktivität zum Reduzieren der Doppelbindung von delta-2-Enoyl-CoA, als Teil des Elongationsprozesses für Fettsäuren, wodurch der verlängerte Acyl-CoA-Ester gebildet wird.

**[0016]** Eine Fettsäure-Elongation wird in vier Schritten katalysiert, die durch vier Enzyme repräsentiert werden: KCS (Keto-Acyl-CoA-Synthase), KCR (Keto-Acyl-CoA-Reduktase), DH (Dehydratase) und ECR (Enoyl-CoA-Reduktase). Im ersten Schritt wird ein Fettsäure-CoA-Ester mit Malonyl-CoA kondensiert, wobei ein Keto-Acyl-CoA-Intermediat, das um zwei Kohlenstoffatome verlängert ist, und CO<sub>2</sub> erzeugt werden. Die Ketogruppe des Intermediats wird dann durch die KCR zu einer Hydroxylgruppe reduziert. Im nächsten Schritt spaltet die DH die Hydroxylgruppe ab (H<sub>2</sub>O wird erzeugt), wobei ein Acyl-2-en-CoA-Ester (delta-2-Enoyl-CoA) gebildet wird. Im letzten Schritt wird die Doppelbindung an Position 2, 3 durch die ECR reduziert, wobei der elongierte Acyl-CoA-Ester gebildet wird (Buchanan, Gruissem, Jones (2000) Biochemistry & Molecular biology of plants, American Society of Plant Physiologists).

**[0017]** In den der vorliegenden Erfindung zugrunde liegenden Untersuchungen wurden Enzyme mit überlegenen Desaturase-, KCS-, KCR-, DH- und ECR-Katalyse-Aktivitäten zur Herstellung von PUFA bereitgestellt.

**[0018]** Weiter bevorzugt zeigen Polynukleotide mit einer Nukleinsäuresequenz, wie in SEQ ID NRn: 1 gezeigt, welche Polypeptide mit Aminosäuresequenzen, wie in SEQ ID NRn: 2 gezeigt, codieren, oder Varianten davon, vorzugsweise d5-Desaturase-Aktivität.

**[0019]** Polynukleotide mit einer Nukleinsäuresequenz, wie in SEQ ID NRn: 4 gezeigt, welche Polypeptide mit Aminosäuresequenzen, wie in SEQ ID NRn: 5 gezeigt, codieren, oder Varianten davon, zeigen vorzugsweise d6-Desaturase-Aktivität.

**[0020]** Polynukleotide mit einer Nukleinsäuresequenz, wie in SEQ ID NRn: 7 und 128 gezeigt, welche Polypeptide mit Aminosäuresequenzen, wie in SEQ ID NRn: 8 und 129 gezeigt, codieren, oder Varianten davon, zeigen vorzugsweise d4-Desaturase-Aktivität.

**[0021]** Polynukleotide mit einer Nukleinsäuresequenz, wie in SEQ ID NRn: 10 gezeigt, welche Polypeptide mit Aminosäuresequenzen, wie in SEQ ID NRn: 11 gezeigt, codieren, oder Varianten davon, zeigen vorzugsweise d8-Desaturase-Aktivität.

**[0022]** Polynukleotide mit einer Nukleinsäuresequenz, wie in SEQ ID NRn: 13 gezeigt, welche Polypeptide mit Aminosäuresequenzen, wie in SEQ ID NRn: 14 gezeigt, codieren, oder Varianten davon, zeigen vorzugsweise d9-Desaturase-Aktivität.

**[0023]** Polynukleotide mit einer Nukleinsäuresequenz, wie in SEQ ID NRn: 16 gezeigt, welche Polypeptide mit Aminosäuresequenzen, wie in SEQ ID NRn: 17 gezeigt, codieren, oder Varianten davon, zeigen vorzugsweise d12-Desaturase-Aktivität.

**[0024]** Polynukleotide mit einer Nukleinsäuresequenz, wie in SEQ ID NRn: 19 gezeigt, welche Polypeptide mit Aminosäuresequenzen, wie in SEQ ID NRn: 20 gezeigt, codieren, oder Varianten davon, zeigen vorzugsweise d15-Desaturase-Aktivität.

**[0025]** Polynukleotide mit einer Nukleinsäuresequenz, wie in SEQ ID NRn: 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43 oder 46 gezeigt, welche Polypeptide mit Aminosäuresequenzen, wie in SEQ ID NRn: 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44 oder 46 gezeigt, codieren, oder Varianten davon, zeigen vorzugsweise Keto-Acyl-CoA-Synthase-Aktivität.

**[0026]** Polynukleotide mit einer Nukleinsäuresequenz, wie in SEQ ID NRn: 49, 52 oder 55 gezeigt, welche Polypeptide mit Aminosäuresequenzen, wie in SEQ ID NRn: 50, 53 oder 56 gezeigt, codieren, oder Varianten davon, zeigen vorzugsweise Keto-Acyl-CoA-Reduktase-Aktivität.

**[0027]** Polynukleotide mit einer Nukleinsäuresequenz, wie in SEQ ID NRn: 58 gezeigt, welche Polypeptide mit Aminosäuresequenzen, wie in SEQ ID NRn: 59 gezeigt, codieren, oder Varianten davon, zeigen vorzugsweise Dehydratase-Aktivität.

**[0028]** Polynukleotide mit einer Nukleinsäuresequenz, wie in SEQ ID NRn: 61 gezeigt, welche Polypeptide mit Aminosäuresequenzen, wie in SEQ ID NRn: 62 gezeigt, codieren, oder Varianten davon, zeigen vorzugsweise Enoyl-CoA-Reduktase-Aktivität.

**[0029]** Ein Polynukleotid, das ein Polypeptid mit einer ECR-Aktivität, wie oben spezifiziert, codiert, wurde in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung vorzugsweise aus *Nannochloropsis oculata* erhalten. Allerdings können Orthologe, Paraloge oder andere Homologe aus anderen Spezies identifiziert werden. Vorzugsweise werden sie aus Pflanzen, wie Algen, zum Beispiel *Isochrysis*, *Mantoniella*, *Ostreococcus* oder *Cryptocodinium*, Algen/Diatomeen wie *Phaeodactylum*, *Thalassiosira* oder *Thraustochytrium*, Moosen, wie *Physcomitrella* oder *Ceratodon*, oder höheren Pflanzen, wie den *Primulaceae*, wie *Aleuritia*, *Calendula stellata*, *Osteospermum spinescens* oder *Osteospermum hyoseroides*, Mikroorganismen wie Pilzen, wie *Aspergillus*, *Phytophthora*, *Entomophthora*, *Mucor* oder *Mortierella*, Bakterien, wie *Shewanella*, Hefen oder Tieren erhalten. Bevorzugte Tiere sind Nematoden, wie *Caenorhabditis*, Insekten oder Wirbeltiere. Unter den Wirbeltieren können die Nukleinsäuremoleküle vorzugsweise aus *Euteleostomi*, *Actinopterygii*; *Neopterygii*; *Teleostei*; *Euteleostei*, *Protacanthopterygii*, *Salmoniformes*; *Salmonidae* oder *Oncorhynchus*, weiter bevorzugt aus der Ordnung der *Salmoniformes*, am meisten bevorzugt der Familie *Salmonidae*, wie der Gattung *Salmo*, zum Beispiel aus den Gattungen und Spezies *Oncorhynchus mykiss*, *Trutta trutta* oder *Salmo trutta fario*, abgeleitet werden. Außerdem können die Nukleinsäuremoleküle aus den Diatomeen, wie etwa den Gattungen *Thalassiosira* oder *Phaeodactylum*, erhalten werden.

**[0030]** Somit beinhaltet der Begriff "Polynukleotid", wie gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet, fernerhin Varianten der oben erwähnten spezifischen Polynukleotide, welche Orthologe, Paraloge oder sonstige Homologe des Polynukleotids der vorliegenden Erfindung repräsentieren. Außerdem schließen Varianten des Polynukleotids der vorliegenden Erfindung auch künstlich erzeugte Muteine ein. Die Muteine schließen z. B. Enzyme, welche durch Mutagenesetechniken erzeugt werden und welche verbesserte oder veränderte Substratspezifität zeigen, oder Codon-optimierte Polynukleotide ein. Die Polynukleotidvarianten umfassen vorzugsweise eine Nukleinsäuresequenz, dadurch gekennzeichnet, dass die Sequenz von den oben genannten spezifischen, in einer beliebigen von SEQ ID NRn: 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 46, 49, 52, 55, 58, 61 oder 128 gezeigten Nukleinsäuresequenzen oder von einem Polynukleotid, das ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz, wie in einer beliebigen von SEQ ID NRn: 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62 oder 129 gezeigt, codiert, durch mindestens eine Nukleotidsubstitution, -addition und/oder -deletion abgeleitet sein kann, wobei die Varianten-Nukleinsäuresequenz immer noch ein Polypeptid mit einer Desaturase-, KCS-, KCR-, DH- oder ECR-Aktivität, wie oben spezifiziert, codieren soll. Varianten beinhalten auch Polynukleotide, die eine Nukleinsäuresequenz umfassen, welche, vorzugsweise unter stringenten Hybridisierungsbedingungen, zum Hybridisieren an die zuvor erwähnten spezifischen Nukleinsäuresequenzen in der Lage ist. Diese stringenten Bedingungen sind dem Fachmann bekannt und können in *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1–6.3.6, gefunden werden. Ein bevorzugtes Beispiel für stringente Hybridisierungsbedingungen sind Hybridisierungsbedingungen in  $6 \times$  Natriumchlorid/Natriumcitrat (= SSC) bei ungefähr  $45^\circ\text{C}$ , gefolgt von einem oder mehreren Waschschritten in  $0,2 \times$  SSC, 0,1% SDS bei 50 bis  $65^\circ\text{C}$ . Der Fachmann weiß, dass diese Hybridisierungsbedingungen

abhängig vom Typ der Nukleinsäure und, zum Beispiel, bei Gegenwart von organischen Lösungsmitteln, in Bezug auf die Temperatur und Konzentration des Puffers abweichen. Zum Beispiel variiert unter "Standard-Hybridisierungsbedingungen" die Temperatur abhängig vom Typ der Nukleinsäure zwischen 42°C und 58°C in wässrigem Puffer mit einer Konzentration von 0,1 bis 5 × SSC (pH 7,2). Wenn organisches Lösungsmittel, zum Beispiel 50% Formamid, in dem oben erwähnten Puffer vorhanden ist, beträgt die Temperatur unter Standardbedingungen ungefähr 42°C. Die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride sind vorzugsweise 0,1 × SSC und 20°C bis 45°C, vorzugsweise zwischen 30°C und 45°C. Die Hybridisierungsbedingungen für DNA:RNA-Hybride sind vorzugsweise 0,1 × SSC und 30°C bis 55°C, vorzugsweise zwischen 45°C und 55°C. Die oben erwähnten Hybridisierungstemperaturen werden zum Beispiel für eine Nukleinsäure mit ungefähr 100 bp (= Basenpaare) Länge und einem G + C-Gehalt von 50% in Abwesenheit von Formamid bestimmt. Der Fachmann weiß, wie man die erforderlichen Hybridisierungsbedingungen bestimmt, indem man auf Lehrbücher Bezug nimmt, wie das oben erwähnte Textbuch, oder die folgenden Lehrbücher: 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 dazu, sind Polynukleotidvarianten durch PCR-basierte Techniken erhältlich, wie etwa gemischte Oligonukleotidprimer-basierte Amplifikation von DNA, d. h. unter Verwendung degenerierter Primer gegen konservierte Domänen der Polypeptide der vorliegenden Erfindung. Konservierte Domänen des Polypeptids der vorliegenden Erfindung können durch einen Sequenzvergleich der Nukleinsäuresequenzen der Polynukleotide oder der Aminosäuresequenzen der Polypeptide der vorliegenden Erfindung identifiziert werden. Oligonukleotide, die als PCR-Primer geeignet sind, sowie geeignete PCR-Bedingungen sind in den begleitenden Beispielen beschrieben. Als Matrize kann DNA oder cDNA aus Bakterien, Pilzen, Pflanzen oder Tieren verwendet werden. Ferner schließen Varianten Polynukleotide ein, die Nukleinsäuresequenzen umfassen, welche mindestens 50%, mindestens 55%, mindestens 60%, mindestens 65%, mindestens 70%, mindestens 75%, mindestens 80%, mindestens 85%, mindestens 90%, mindestens 95%, mindestens 98% oder mindestens 99% identisch zu den, in einer beliebigen von SEQ ID NRn: 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 46, 49, 52, 55, 58, 61 oder 128 gezeigten Nukleinsäuresequenzen sind, die vorzugsweise Polypeptide codieren, welche eine Desaturase-, KCS-, KCR-, DH- oder ECR-Aktivität, wie oben spezifiziert, beibehalten. Außerdem sind auch Polynukleotide eingeschlossen, welche Nukleinsäuresequenzen umfassen, die ein Polypeptid mit Aminosäuresequenzen codieren, welche mindestens 50%, mindestens 55%, mindestens 60%, mindestens 65%, mindestens 70%, mindestens 75%, mindestens 80%, mindestens 85%, mindestens 90%, mindestens 95%, mindestens 98% oder mindestens 99% identisch zu den Aminosäuresequenzen sind, die in einer beliebigen von SEQ ID NRn: 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62 oder 129 gezeigt sind, wobei das Polypeptid vorzugsweise Desaturase-, KCS-, KCR-, DH- oder ECR-Aktivität, wie oben spezifiziert, beibehält. Die prozentualen Identitätswerte werden vorzugsweise über die gesamte Aminosäure- oder Nukleinsäure-Sequenzregion berechnet. Eine Reihe von Programmen, basierend auf einer Vielzahl von Algorithmen, steht dem Fachmann zum Vergleichen verschiedener Sequenzen zur Verfügung. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die prozentuale Identität zwischen zwei Aminosäuresequenzen unter Verwendung des Algorithmus von Needleman und Wunsch (Needleman 1970, J. Mol. Biol. (48):444–453) bestimmt, der in das Needle-Programm im EMBOSS-Software-Paket (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice, P., Longden, I., und Bleasby, A., Trends in Genetics 16(6), 276–277, 2000) eingebunden wurde, wobei entweder eine BLOSUM 45- oder PAM250-Wertungsmatrix für entfernt verwandte Proteine, oder entweder eine BLOSUM 62- oder PAM160-Wertungsmatrix für näher verwandte Proteine, und ein Lückenöffnungs-Strafwert von 16, 14, 12, 10, 8, 6, oder 4 und ein Lückenerweiterungs-Strafwert von 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, oder 6 zur Anwendung kommen. Anleitungen zur lokalen Installation des EMBOSS-Pakets sowie Links zu WEB-Services kann man unter <http://emboss.sourceforge.net> finden. Ein bevorzugtes, nicht-einschränkendes Beispiel von Parametern, die zum Alignieren von zwei Aminosäuresequenzen mit Hilfe des Needle-Programms verwendet werden sollen, sind die Vorgabeparameter, welche die EBLOSUM62-Wertungsmatrix, einen Lückenöffnungsstrafwert von 10 und einen Lückenerweiterungsstrafwert von 0,5 einschließen. In noch einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird die prozentuale Identität zwischen zwei Nukleotidsequenzen unter Verwendung des Needle-Programms im EMBOSS-Softwarepaket (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice, P., Longden, I. und Bleasby, A., Trends in Genetics 16(6), 276–277, 2000), mit Hilfe der EDNAFULL-Wertungsmatrix und einem Lückenöffnungsstrafwert von 16, 14, 12, 10, 8, 6, oder 4 und einem Lückenerweiterungsstrafwert von 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, oder 6 bestimmt. Ein bevorzugtes, nicht-einschränkendes Beispiel von Parametern, die zusammenwirkend zur Alignierung zweier Nukleinsäuresequenzen mit Hilfe des Needle-Programms zu verwenden sind, sind die Vorgabeparameter, welche die EDNAFULL-Wertungsmatrix, einen Lückenöffnungsstrafwert von 10 und einen Lückenerweiterungsstrafwert von 0,5 einschließen. Die Nukleinsäure- und Proteinsequenzen der vorliegenden Erfindung können ferner als eine "Suchsequenz" verwendet werden, um eine Suche gegen öffentliche Datenbanken durchzuführen, um zum Beispiel andere Familienmitglieder oder verwandte Sequenzen zu identifizieren. Derartige Suchen können unter Verwendung der

BLAST-Programmserie (Version 2.2) von Altschul et al. (Altschul 1990, J. Mol. Biol. 215:403–10) durchgeführt werden. BLAST unter Verwendung von Desaturase-, KCS-, KCR-, DH- oder ECR-Nukleinsäuresequenzen der Erfindung als Suchsequenz kann mit BLASTn, BLASTx oder dem Programm tBLASTx unter Verwendung von Standardparametern durchgeführt werden, um entweder Nukleotidsequenzen (BLASTn, tBLASTx) oder Aminosäuresequenzen (BLASTx) zu erhalten, welche homolog zu Desaturase-, KCS-, KCR-, DH- oder ECR-Sequenzen der Erfindung sind. BLAST unter Verwendung von Desaturase-, KCS-, KCR-, DH- oder ECR-Proteinsequenzen der Erfindung als Suchsequenz kann mit dem BLASTp- oder dem tBLASTn-Programm unter Verwendung von Standardparametern durchgeführt werden, um entweder Aminosäuresequenzen (BLASTp) oder Nukleinsäuresequenzen (tBLASTn) zu erhalten, welche homolog zu Desaturase-, KCS-, KCR-, DH- oder ECR-Sequenzen der Erfindung sind. Zum Erhalt von lückenhaftigen Alignments zu Vergleichszwecken kann "Gapped BLAST" unter Verwendung von Standardparametern angewandt werden, wie in Altschul et al. (Altschul 1997, Nucleic Acids Res. 25(17):3389–3402) beschrieben.

Tabelle 1: Beziehung der Sequenztypen: DNA oder PRT (Protein) von Such- und Treffer-Sequenzen für verschiedene BLAST-Programme

| Input-Suchsequenz | konvertierte Suche | Algorithmus | konvertierter Treffer | Tatsächliche Datenbank |
|-------------------|--------------------|-------------|-----------------------|------------------------|
| DNA               |                    | BLASTp      |                       | DNA                    |
| PRT               |                    | BLASTp      |                       | PRT                    |
| DNA               | PRT                | BLASTx      |                       | PRT                    |
| PRT               |                    | tBLASTn     | PRT                   | DNA                    |
| DNA               | PRT                | tBLASTx     | PRT                   | DNA                    |

**[0031]** Ein Polynukleotid, das ein Fragment von beliebigen der oben erwähnten Nukleinsäuresequenzen umfasst, ist ebenfalls als ein Polynukleotid der vorliegenden Erfindung inbegriffen. Die Fragmente sollen Polypeptide codieren, die immer noch Desaturase-, KCS-, KCR-, DH- oder ECR-Aktivität, wie oben spezifiziert, aufweisen. Demzufolge kann das Polypeptid die Domänen des Polypeptids der vorliegenden Erfindung, welche die besagte biologische Aktivität verleihen, umfassen oder daraus bestehen. Ein Fragment, wie hierin gemeint, umfasst vorzugsweise mindestens 50, mindestens 100, mindestens 250 oder mindestens 500 aufeinanderfolgende Nukleotide von einer beliebigen der oben erwähnten Nukleinsäuresequenzen oder codiert eine Aminosäuresequenz, die mindestens 20, mindestens 30, mindestens 50, mindestens 80, mindestens 100 oder mindestens 150 aufeinanderfolgende Aminosäuren von einer beliebigen der oben erwähnten Aminosäuresequenzen umfasst.

**[0032]** Die oben genannten Variantenpolynukleotide oder Fragmente codieren vorzugsweise Polypeptide, welche Desaturase-, KCS-, KCR-, DH- oder ECR-Aktivität zu einem signifikanten Ausmaß, vorzugsweise zu mindestens 10%, mindestens 20%, mindestens 30%, mindestens 40%, mindestens 50%, mindestens 60%, mindestens 70%, mindestens 80% oder mindestens 90% der Desaturase-, KCS-, KCR-, DH- oder ECR-Aktivität, welche von einem beliebigen der in einer beliebigen von SEQ ID NRn: 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62 oder 129 gezeigten Polypeptide aufgezeigt wird, beibehalten. Die Aktivität kann wie in den begleitenden Beispielen beschrieben getestet werden.

**[0033]** Die Polynukleotide der vorliegenden Erfindung bestehen entweder im Wesentlichen aus den oben erwähnten Nukleinsäuresequenzen oder umfassen die oben erwähnten Nukleinsäuresequenzen. Somit können sie auch weitere Nukleinsäuresequenzen enthalten. Vorzugsweise kann das Polynukleotid der vorliegenden Erfindung zusätzlich zu einem offenen Leserahmen weitere untranslatierte Sequenz am 3'- und am 5'-Ende der codierenden Genregion umfassen: mindestens 500, vorzugsweise 200, weiter bevorzugt 100 Nukleotide der Sequenz stromaufwärts des 5'-Endes der codierenden Region und mindestens 100, vorzugsweise 50, weiter bevorzugt 20 Nukleotide der Sequenz stromabwärts des 3'-Endes der codierenden Genregion. Darüber hinaus können die Polynukleotide der vorliegenden Erfindung Fusionsproteine codieren, worin ein Partner des Fusionsproteins ein Polypeptid ist, das durch eine oben genannte Nukleinsäuresequenz codiert wird. Solche Fusionsproteine können als zusätzlichen Teil andere Enzyme der Fettsäure- oder PUFA-Biosynthesewege, Polypeptide zur Überwachung der Expression (z. B. grün, gelb, blau oder rot fluoreszierende Proteine, alkalische Phosphatase und dergleichen) oder sogenannte "Tags" umfassen, die als ein detektierbarer Marker oder als Hilfsmaßnahme zu Reinigungszwecken dienen können. Tags für die verschiedenen Zwecke sind im Fachgebiet allgemein bekannt und umfassen FLAG-Tags, 6-Histidin-Tags, MYC-Tags und dergleichen.

**[0034]** Das Polynukleotid der vorliegenden Erfindung soll vorzugsweise entweder als ein isoliertes Polynukleotid (d. h. gereinigt oder zumindest isoliert aus seinem natürlichen Kontext, wie etwa seinem natürlichen Gen-Locus) oder in genetisch modifizierter oder exogen (d. h. künstlich) manipulierter Form bereitgestellt werden. Ein isoliertes Polynukleotid kann zum Beispiel weniger als ungefähr 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb oder 0,1 kb Nukleotidsequenzen umfassen, welche das Nukleinsäuremolekül in der genomischen DNA der Zelle, aus der die Nukleinsäure abgeleitet ist, von Natur aus flankieren. Das Polynukleotid wird vorzugsweise in der Form eines doppel- oder einzelsträngigen Moleküls bereitgestellt. Es versteht sich, dass die vorliegende Erfindung mit der Bezugnahme auf beliebige der oben erwähnten Polynukleotide der Erfindung ebenfalls komplementäre oder reverse komplementäre Stränge der spezifischen Sequenzen oder Varianten davon, welche vorangehend aufgeführt wurden, betrifft. Das Polynukleotid schließt DNA, einschließlich cDNA und genomischer DNA, oder RNA-Polynukleotide ein.

**[0035]** Allerdings betrifft die vorliegende Erfindung ebenfalls Polynukleotidvarianten, welche aus den Polynukleotiden der vorliegenden Erfindung abgeleitet sind und zur Störung bzw. Querbeeinflussung der Transkription oder Translation der Polynukleotide der vorliegenden Erfindung in der Lage sind. Derartige Variantenpolynukleotide schließen Antisense-Nukleinsäuren, Ribozyme, siRNA-Moleküle, Morpholino-Nukleinsäuren (Phosphordiamidat-Morpholino-Oligos), Tripelhelix bildende Oligonukleotide, inhibitorische Oligonukleotide, oder Mikro-RNA-Moleküle ein, von denen alle das Polynukleotid der Erfindung aufgrund der Anwesenheit von komplementären oder im Wesentlichen komplementären Sequenzen spezifisch erkennen sollen. Diese Techniken sind dem Fachmann auf dem Gebiet allgemein bekannt. Geeignete Variantenpolynukleotide der oben genannten Art können leicht auf Grundlage der Struktur der Polynukleotide dieser Erfindung entworfen werden.

**[0036]** Darüber hinaus sind auch chemisch modifizierte Polynukleotide, einschließlich natürlich vorkommenden modifizierten Polynukleotiden, wie etwa glycosylierten oder methylierten Polynukleotiden, oder künstlich modifizierten, wie etwa biotinylierten Polynukleotiden, eingeschlossen.

**[0037]** In den der vorliegenden Erfindung zugrunde liegenden Untersuchungen wurden in vorteilhafter Weise Polynukleotide identifiziert, welche Desaturasen, Keto-Acyl-CoA-Synthasen, Keto-Acyl-CoA-Reduktasen, Dehydratasen und Enoyl-CoA-Reduktasen von *Nannochloropsis oculata* oder *Monosiga brevicollis* codieren. Insbesondere sind die *Nannochloropsis oculata*-d4-Desaturase (d4DES(No)), -d5-Desaturase (d5DES(No)), -d6-Desaturase (d6DES(No)), -d8-Desaturase (d8DES(No)), -d9-Desaturase (d9DES(No)), -d12-Desaturase (d12DES(No)), -d15-Desaturase (d15DES(No)), Keto-Acyl-CoA-Synthase (Elo(No)), Keto-Acyl-CoA-Reduktase (KCR(No)), Dehydratase (DH(No)) und Enoyl-CoA-Reduktase (ECR(No)) identifiziert worden. Darüber hinaus ist insbesondere die *Monosiga brevicollis*-d4-Desaturase d4Des(Mb) identifiziert worden. Die Polynukleotide der vorliegenden Erfindung sind besonders für die rekombinante Herstellung von LCPUFAs und insbesondere von Arachidonsäure (ARA), Ecosapentaensäure (EPA) und/oder Docosapentaensäure (DHA) geeignet.

**[0038]** In einer bevorzugten Ausführungsform des Polynukleotids der vorliegenden Erfindung umfasst das Polynukleotid ferner eine Expressions-Steuerungssequenz, die operativ an die Nukleinsäuresequenz verknüpft ist.

**[0039]** Der Begriff "Expressions-Steuerungssequenz", wie hierin verwendet, bedeutet eine Nukleinsäuresequenz, welche zum Regeln, d. h. Initiieren und Steuern, der Transkription einer Nukleinsäuresequenz von Interesse, im vorliegenden Fall der oben genannten Nukleinsequenzen, in der Lage ist. Eine derartige Sequenz umfasst üblicherweise einen Promotor oder eine Kombination von einem Promotor und Enhancersequenzen, oder besteht daraus. Die Expression eines Polynukleotids umfasst die Transkription des Nukleinsäuremoleküls, vorzugsweise in eine translatierbare mRNA. Zusätzliche regulatorische Elemente können transkriptionelle sowie translationale Enhancer einschließen. Die folgenden Promotoren und Expressions-Steuerungssequenzen können vorzugsweise in einem Expressionsvektor gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Die Promotoren *cos*, *tac*, *trp*, *tet*, *trp-tet*, *lpp*, *lac*, *lpp-lac*, *lacIq*, T7, T5, T3, *gal*, *trc*, *ara*, SP6,  $\lambda$ -PR oder  $\lambda$ -PL werden vorzugsweise in gramnegativen Bakterien verwendet. Für grampositive Bakterien können die Promotoren *amy* und *SPO2* verwendet werden. Unter den Hefe- oder Pilz-Promotoren werden vorzugsweise *ADC1*, *AOX1r*, *GAL1*, *MF $\alpha$* , *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH*, *TEF*, *rp28*, *ADH* verwendet. Für tierische Zell- oder Organismus-Expression werden vorzugsweise die Promotoren CMV-, SV40-, RSV-Promotor (Rous-Sarkom-Virus), CMV-Enhancer, SV40-Enhancer verwendet. Aus Pflanzen die Promotoren CaMV/35S (Franck 1980, Cell 21: 285–294), PRP1 (Ward 1993, Plant. Mol. Biol. 22), SSU, OCS, *lib4*, *usp*, STLS1, B33, *nos* oder der Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor. Ebenfalls bevorzugt in diesem Kontext sind induzierbare Promotoren, wie die Promotoren, welche in EP 0 388 186 A1 (d. h. ein Benzylsulfonamid-induzierbarer Promotor), Gatz 1992, Plant J. 2:397–404 (d. h. ein Tetracyclin-induzierbarer Promotor), EP 0 335 528 A1 (d. h. ein Abscisinsäure-



induzierbarer Promotor) oder WO 93/21334 (d. h. ein Ethanol- oder Cyclohexenol-induzierbarer Promotor) beschrieben sind. Weitere geeignete pflanzliche Promotoren sind der Promotor von cytosolischer FBPase oder der ST-LSI-Promotor aus Kartoffel (Stockhaus 1989, EMBO J. 8, 2445), der Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase-Promotor aus Glycine max (Genbank Zugangs-Nr. U87999) oder der Nodus-spezifische Promotor, der in EP 0 249 676 A1 beschrieben ist. Besonders bevorzugt sind Promotoren, welche die Expression in Geweben ermöglichen, die an der Biosynthese von Fettsäuren beteiligt sind. Ebenfalls besonders bevorzugt sind Samenspezifische Promotoren, wie der USP-Promotor, je nach der Praxis bzw. Ausführung, aber auch andere Promotoren, wie die LeB4-, DC3-, Phaseolin- oder Napin-Promotoren. Weitere besonders bevorzugte Promotoren sind Samen-spezifische Promotoren, welche für monokotyle oder dikotyle Pflanzen verwendet werden können und welche beschrieben sind in US 5 608 152 (Napin-Promotor aus Ölsamenraps), WO 98/45461 (Oleosin-Promotor aus Arabidopsis, US 5 504 200 (Phaseolin-Promotor aus Phaseolus vulgaris), WO 91/13980 (Bce4-Promotor aus Brassica), bei Baumlein et al., Plant J., 2, 2, 1992:233–239 (LeB4-Promotor aus einer Leguminose), wobei diese Promotoren für Dikotyle geeignet sind. Die folgenden Promotoren sind für Monokotyle geeignet: lpt-2- oder lpt-1-Promotor aus Gerste (WO 95/15389 und WO 95/23230), Hordein-Promotor aus Gerste, und andere Promotoren, welche geeignet sind und welche in WO 99/16890 beschrieben sind. Im Prinzip, ist es möglich, für das neue Verfahren alle natürlichen Promotoren zusammen mit ihren regulatorischen Sequenzen, wie jenen, die oben erwähnt wurden, zu verwenden. In gleicher Weise ist es möglich und vorteilhaft, synthetische Promotoren zu verwenden, entweder zusätzlich oder allein, insbesondere wenn sie eine Samen-spezifische Expression vermitteln, zum Beispiel wie es in WO 99/16890 beschrieben ist. In einer besonderen Ausführungsform werden Samen-spezifische Promotoren verwendet, um die Herstellung der gewünschten PUFA oder LCPUFA zu steigern.

**[0040]** Der Begriff "operativ verknüpft", wie hierin verwendet, bedeutet, dass die Expressions-Steuerungssequenz und die Nukleinsäure von Interesse so verknüpft sind, dass die Expression der Nukleinsäure von Interesse von der Expressions-Steuerungssequenz reguliert werden kann, d. h. die Expressions-Steuerungssequenz soll funktionell mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz verknüpft sein. Demgemäß können die Expressions-Steuerungssequenz und die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz physikalisch miteinander verknüpft sein, z. B. durch Inserieren der Expressions-Steuerungssequenz am 5'-Ende der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz. Alternativ dazu können die Expressions-Steuerungssequenz und die zu exprimierende Nukleinsäure lediglich in physikalischer Nähe liegen, so dass die Expressions-Steuerungssequenz zum Regulieren der Expression von mindestens einer Nukleinsäuresequenz von Interesse in der Lage ist. Die Expressions-Steuerungssequenz und die zu exprimierende Nukleinsäure sind vorzugsweise durch nicht mehr als 500 bp, 300 bp, 100 bp, 80 bp, 60 bp, 40 bp, 20 bp, 10 bp oder 5 bp getrennt.

**[0041]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des Polynukleotids der vorliegenden Erfindung umfasst das Polynukleotid ferner eine Terminatorsequenz, die operativ mit der Nukleinsäuresequenz verknüpft ist.

**[0042]** Der Begriff "Terminator", wie hierin verwendet, bezieht sich auf eine Nukleinsäuresequenz, welche zum Beenden der Transkription in der Lage ist. Diese Sequenzen verursachen die Dissoziation der Transkriptionsmaschinerie von der zu transkribierenden Nukleinsäuresequenz. Vorzugsweise soll der Terminator in Pflanzen, und insbesondere in Pflanzensamen, aktiv sein. Geeignete Terminatoren sind im Fachgebiet bekannt und schließen vorzugsweise Polyadenylierungssignale, wie die SV40-poly-A-Stelle oder die tk-poly-A-Stelle oder eines der pflanzenspezifischen Signale, die in Loke et al. (Loke 2005, Plant Physiol 138, S. 1457–1468) aufgeführt sind, stromabwärts der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz ein.

**[0043]** Die vorliegende Erfindung betrifft auch einen Vektor, der das Polynukleotid der vorliegenden Erfindung umfasst.

**[0044]** Der Begriff "Vektor" beinhaltet vorzugsweise Phagen-, Plasmid-, virale Vektoren sowie künstliche Chromosomen, wie künstliche Bakterien- oder Hefe-Chromosomen. Außerdem bezieht sich der Begriff auch auf Targetingkonstrukte, welche die zufällige oder ortsgerichtete Integration des Targetingkonstrukts in genomische DNA erlauben. Solche Targetingkonstrukte umfassen vorzugsweise DNA von ausreichender Länge für eine entweder homologe oder heterologe Rekombination, wie es nachstehend im Einzelnen beschrieben wird. Der Vektor, der das Polynukleotid der vorliegenden Erfindung beinhaltet, umfasst vorzugsweise ferner selektierbare Marker zur Vermehrung und/oder zur Selektion in einem Wirt. Der Vektor kann durch verschiedene im Fachgebiet allgemein bekannte Techniken in eine Wirtszelle eingeführt werden. Nachdem er in eine Wirtszelle eingebracht worden ist, kann der Vektor im Cytoplasma vorliegen oder kann in das Genom eingebaut werden. Im letztgenannten Fall versteht es sich, dass der Vektor ferner Nukleinsäuresequenzen umfassen kann, die eine homologe Rekombination oder heterologe Insertion erlauben. Vektoren können über herkömmliche Transformations- oder Transfektionstechniken in prokaryotische oder eukaryotische Zellen eingebracht werden. Die

Begriffe "Transformation" und "Transfektion", Konjugation und Transduktion, wie im vorliegenden Zusammenhang verwendet, sollen eine Vielzahl von im Stand der Technik bekannten Verfahren zum Einbringen fremder Nukleinsäure (zum Beispiel DNA) in eine Wirtszelle, einschließlich Calciumphosphat-, Rubidiumchlorid- oder Calciumchlorid-Coprazipitation, DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion, Lipofektion, natürliche Kompetenz, Kohlenstoff-basierten Clustern, chemisch vermitteltem Transfer, Elektroporation oder Teilchenbeschuss, umfassen. Geeignete Verfahren zur Transformation oder Transfektion von Wirtszellen, einschließlich Pflanzenzellen, können in Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) und anderen Laborhandbüchern, wie Methods in Molecular Biology, 1995, Bd. 44, Agrobacterium protocols, Hrsg.: Gartland und Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey, gefunden werden. Alternativ kann ein Plasmidvektor durch Hitzeschock- oder Elektroporationstechniken eingeführt werden. Sollte es sich bei dem Vektor um ein Virus handeln, kann es mit Hilfe einer passenden Verpackungs-Zelllinie vor dem Anwenden auf Wirtszellen in vitro verpackt werden.

**[0045]** Vorzugsweise ist der hier umschriebene Vektor als Klonierungsvektor geeignet, d. h. in mikrobiellen Systemen replizierbar. Derartige Vektoren sichern eine effiziente Klonierung in Bakterien, und, vorzugsweise, Hefen oder Pilzen, und ermöglichen die stabile Transformation von Pflanzen. Insbesondere müssen hierbei diverse binäre und co-integrierte Vektorsysteme genannt werden, die für die T-DNA-vermittelte Transformation geeignet sind. Derartige Vektorsysteme sind in der Regel dadurch gekennzeichnet, dass sie zumindest die für die Agrobacterium-vermittelte Transformation benötigten vir-Gene sowie die T-DNA begrenzenden Sequenzen (T-DNA-Border) beinhalten. Vorzugsweise umfassen diese Vektorsysteme auch weitere cis-regulatorische Regionen, wie Promotoren und Terminatoren und/oder Selektionsmarker, mit denen entsprechend transformierte Wirtszellen oder Organismen identifiziert werden können. Während bei co-integrierten Vektorsystemen vir-Gene und T-DNA-Sequenzen auf demselben Vektor angeordnet sind, basieren binäre Systeme auf wenigstens zwei Vektoren, von denen einer vir-Gene, aber keine T-DNA, und ein zweiter T-DNA, jedoch kein vir-Gen, trägt. Als Folge davon sind die letztgenannten Vektoren relativ klein, leicht zu manipulieren, und können sowohl in *E. coli* als auch in *Agrobacterium* repliziert werden. Zu diesen binären Vektoren zählen Vektoren der Serien pBIB-HYG, pPZP, pBecks, pGreen. Erfindungsgemäß bevorzugt verwendet werden Bin19, pBI101, pBinAR, pGPTV und pCAMBIA. Eine Übersicht über binäre Vektoren und ihre Verwendung kann in Hellens et al., Trends in Plant Science (2000) 5, 446–451, gefunden werden. Ferner können die Polynukleotide durch Verwenden entsprechender Klonierungsvektoren in Wirtszellen oder Organismen, wie Pflanzen oder Tiere, eingebracht werden und somit bei der Transformation von Pflanzen verwendet werden, wie jenen, die 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 1991, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42, 205–225, veröffentlicht und zitiert sind.

**[0046]** Weiter bevorzugt ist der Vektor der vorliegenden Erfindung ein Expressionsvektor. In einem solchen Expressionsvektor, d. h. einem Vektor, der das Polynukleotid der Erfindung umfasst, ist die Nukleinsäuresequenz operativ mit einer Expressions-Steuerungssequenz verbunden (ebenfalls als "Expressionskassette" bezeichnet), welche die Expression in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen oder isolierten Fraktionen davon erlaubt. Geeignete Expressionsvektoren sind im Fachgebiet bekannt, wie etwa der Okayama-Berg-cDNA-Expressionsvektor pcDV1 (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (Invitrogen) oder pSPORT1 (GIBCO BRL). Weitere Beispiele von typischen Fusions-Expressionsvektoren sind pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith 1988, Gene 67:31–40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) und pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), worin Glutathion-S-transferase (GST), Maltose-E-bindendes Protein bzw. Protein A mit dem rekombinanten Zielprotein fusioniert sind. Beispiele von geeigneten induzierbaren Nichtfusion-*E. coli*-Expressionsvektoren sind, unter anderem, pTrc (Amann 1988, Gene 69:301–315) und pET 11d (Studier 1990, Methods in Enzymology 185, 60–89). Die Zielgenexpression des pTrc-Vektors basiert auf der Transkription von einem hybriden *trp-lac*-Fusionspromotor aus durch Wirts-RNA-Polymerase. Die Zielgenexpression aus dem pET11d-Vektor basiert auf der Transkription von einem T7-gn10-*lac*-Fusionspromotor aus, welche von einer coexprimierten viralen RNA-Polymerase (T7 gn1) vermittelt wird. Diese virale Polymerase wird von den Wirtsstämmen BL21 (DE3) oder HMS174 (DE3) aus einem residenten  $\lambda$ -Prophagen bereitgestellt, der ein T7 gn1-Gen unter der transkriptionellen Steuerung des *lacUV5*-Promotors beherbergt. Der Fachmann ist mit anderen Vektoren vertraut, welche in prokaryotischen Organismen geeignet sind; diese Vektoren sind zum Beispiel, in *E. coli*, pLG 338, pACYC184, die pBR-Serie, wie pBR322, die pUC-Serie, wie pUC18 oder pUC19, die M13mp-Serie, pKC 30, pRep4, pHS1, pHS2, pHLC236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III113-B1, *lgt11* oder pBdCl, in *Streptomyces* pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361, in *Bacillus* pUB110, pC194 oder pBD214, in *Corynebacterium* pSA 77 oder pAJ667. Beispiele von Vektoren für die Expression in der Hefe *S. cerevisiae* umfassen pYep Sec1 (Baldari 1987, Embo J. 6:229–234), pMFa (Kurjan 1982, Cell 30:933–943), pJRY88 (Schultz 1987, Gene 54:

113–123) und pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren und Verfahren für die Konstruktion von Vektoren, welche zur Verwendung in anderen Pilzen geeignet sind, wie etwa den filamentösen Pilzen, umfassen diejenigen, welche ausführlich beschrieben sind in: van den Hondel, C. A. M. J. J., & Punt, P. J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi", in: Applied Molecular Genetics of fungi, J. F. Peberdy et al., Hrsg., S. 1–28, Cambridge University Press: Cambridge, oder in: More Gene Manipulations in Fungi (J. W. Bennett & L. L. Lasure, Hrsg., S. 396–428: Academic Press: San Diego). Weitere geeignete Hefevektoren sind zum Beispiel pAG-1, YEp6, YEp13 oder pEMBLye23. Als Alternative können die Polynukleotide der vorliegenden Erfindung auch in Insektenzellen unter Anwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren exprimiert werden. Baculovirus-Vektoren, welche für die Expression von Proteinen in kultivierten Insektenzellen (zum Beispiel Sf9-Zellen) verfügbar sind, umfassen die pAc-Serie (Smith 1983, Mol. Cell Biol. 3:2156–2165) und die pVL-Serie (Lucklow 1989, Virology 170:31–39).

**[0047]** Das Polynukleotid der vorliegenden Erfindung kann in einzelligen Pflanzenzellen (wie Algen), siehe Falciatore 1999, Marine Biotechnology 1 (3):239–251, und die darin zitierten Bezugsstellen, und Pflanzenzellen aus höheren Pflanzen (zum Beispiel Spermatophyten, wie anbaufähigen Nutzpflanzen) durch Verwendung von Pflanzenexpressionsvektoren exprimiert werden. Beispiele von Pflanzenexpressionsvektoren umfassen diejenigen, welche ausführlich in: Becker 1992, Plant Mol. Biol. 20:1195–1197; Bevan 1984, 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, beschrieben werden. Eine Pflanzenexpressionskassette umfasst vorzugsweise regulatorische Sequenzen, welche zur Steuerung der Genexpression in Pflanzenzellen in der Lage sind, und welche funktionell so verknüpft sind, dass jede Sequenz ihre Funktion, wie etwa transkriptionelle Termination, erfüllen kann, zum Beispiel Polyadenylierungs-Signale. Bevorzugte Polyadenylierungs-Signale sind diejenigen, die aus *Agrobacterium tumefaciens*-T-DNA abgeleitet sind, wie dem Gen 3 des Ti-Plasmids pTiACH5, das als Octopin-Synthase bekannt ist (Gielen 1984, EMBO J. 3, 835) oder funktionale Äquivalente derselben, aber alle anderen Terminatoren, die in Pflanzen funktionell aktiv sind, sind auch geeignet. Da Pflanzen-Genexpression sehr häufig nicht auf transkriptionelle Spiegel beschränkt ist, umfasst eine Pflanzenexpressionskassette vorzugsweise andere funktionell verknüpfte Sequenzen, wie Translationsenhancer, zum Beispiel die Overdrive-Sequenz, welche die 5'-untranslatierte Tabakmosaikvirus-Leadersequenz umfasst, die das Protein/RNA-Verhältnis erhöht (Gallie 1987, Nucl. Acids Research 15:8693–8711). Wie oben beschrieben, muss Pflanzen-Genexpression funktionell mit einem geeigneten Promotor verknüpft sein, der die Expression des Gens in einer zeitlichen, zellspezifischen oder gewebespezifischen Weise ausführt. Promotoren, die verwendet werden können, sind konstitutive Promotoren (Benfey 1989, EMBO J. 8: 2195–2202) wie jene, die aus Pflanzenviren abgeleitet sind, wie etwa 35S CAMV (Franck 1980, Cell 21:285–294), 19S CaMV (siehe US 5 352 605 und WO 84/02913) oder pflanzliche Promotoren, wie der Promotor der kleinen Rubisco-Untereinheit, der in US 4 962 028 beschrieben ist. Andere bevorzugte Sequenzen für die Verwendung zur funktionsfähigen Verbindung in Pflanzengenexpressions-Kassetten sind Targeting-Sequenzen, die zur Lenkung des Genproduktes in sein entsprechendes Zellkompartiment (siehe eine Übersicht in Kermode 1996, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4: 285–423 und darin zitierte Literaturstellen), beispielsweise in die Vakuole, den Zellkern, alle Arten von Plastiden, wie Amyloplasten, Chloroplasten, Chromoplasten, den extrazellulären Raum, die Mitochondrien, das Endoplasmatische Retikulum, Ölkörper, Peroxisomen und andere Kompartimente von Pflanzenzellen, notwendig sind. Die Pflanzengenexpression kann, wie oben beschrieben, auch über einen chemisch induzierbaren Promotor erleichtert werden (siehe eine Übersicht in Gatz 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48:89–108). Chemisch induzierbare Promotoren eignen sich besonders, wenn gewünscht wird, dass Gene auf zeitspezifische Weise exprimiert werden. Beispiele für solche Promotoren sind ein Salicylsäure-induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein Tetracyclin-induzierbarer Promotor (Gatz 1992, Plant J. 2, 397–404) und ein Ethanol-induzierbarer Promotor. Auch Promotoren, die auf biotische oder abiotische Stressbedingungen reagieren, sind geeignete Promotoren, beispielsweise der pathogeninduzierte PRP1-Gen-Promotor (Ward 1993, Plant Mol. Biol. 22:361–366), der hitzeinduzierbare hsp80-Promotor aus Tomate (US 5 187 267), der kälteinduzierbare Alpha-Amylase-Promotor aus Kartoffel (WO 96/12814) oder der durch Wunden induzierbare pinII-Promotor (EP 0 375 091 A). Es sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, welche die Expression von Genen in Geweben und Organen, in denen die Fettsäure-, Lipid- und Ölbiosynthese stattfindet, in Samenzellen, wie den Zellen des Endosperms und des sich entwickelnden Embryos, herbeiführen. Geeignete Promotoren sind der Napingen-Promotor aus Ölsamenraps (US 5 608 152), der USP-Promotor aus *Vicia faba* (Baeumlein 1991, Mol. Gen. Genet. 225 (3):459–67), der Oleosin-Promotor aus *Arabidopsis* (WO 98/45461), der Phaseolin-Promotor aus *Phaseolus vulgaris* (US 5 504 200), der Bce4-Promotor aus *Brassica* (WO 91/13980) oder der Legumin B4-Promotor (LeB4; Baeumlein 1992, Plant Journal, 2 (2):233–9), sowie Promotoren, welche die Samen-spezifische Expression in monokotylen Pflanzen, wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis und dergleichen herbeiführen. Geeignete beachtenswerte Promotoren sind der lpt2- oder lpt1-Gen-Promotor aus Gerste (WO 95/15389 und WO 95/23230) oder die in WO 99/16890 beschriebenen (Promotoren aus dem Gerste-Hordein-Gen, dem Reis-Glutelin-Gen, dem Reis-Oryzin-Gen, dem

Reis-Prolamin-Gen, dem Weizen-Gliadin-Gen, Weizen-Glutelin-Gen, dem Mais-Zein-Gen, dem Hafer-Glutelin-Gen, dem Sorghum-Kasirin-Gen, dem Roggen-Secalin-Gen). Dergleichen sind Promotoren besonders geeignet, welche die plastidenspezifische Expression herbeiführen, da Plastiden das Kompartiment sind, in dem die Synthetisierung der Vorläufer und mancher Endprodukte der Lipidbiosynthese erfolgt. Geeignete Promotoren, wie der virale RNA-Polymerase-Promotor, sind in WO 95/16783 und WO 97/06250 beschrieben, und der clpP-Promotor aus *Arabidopsis* wird in WO 99/46394 beschrieben.

**[0048]** Die oben genannten Vektoren bieten nur einen kleinen Überblick über Vektoren, die gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden sollen. Weitere Vektoren sind dem Fachmann bekannt und sind zum Beispiel beschrieben in: *Cloning Vectors* (Hrsg.: Pouwels, P. H., et al., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018). Für weitere geeignete Expressionssysteme für prokaryotische und eukaryotische Zellen siehe die Kapitel 16 und 17 von Sambrook, a. a. O.

**[0049]** Aus dem oben genannten ergibt sich, dass der Vektor vorzugsweise ein Expressionsvektor ist. Weiter bevorzugt steht das Polynukleotid der vorliegenden Erfindung unter der Steuerung eines Samen-spezifischen Promotors in dem Vektor der vorliegenden Erfindung. Ein bevorzugter Samen-spezifischer Promotor, wie hierin gemeint, wird gewählt aus der Gruppe, die aus Conlinin 1, Conlinin 2, Napin, LuFad3, USP, LeB4, Arc, Fae, ACP, LuPXR und SBP besteht. Zu Einzelheiten siehe z. B. US 2003-0159174.

**[0050]** Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung eine Wirtszelle, welche das Polynukleotid oder den Vektor der vorliegenden Erfindung umfasst.

**[0051]** Vorzugsweise ist die Wirtszelle eine pflanzliche Zelle und, weiter bevorzugt, eine aus einer Ölsaat-Nutzpflanze erhaltene pflanzliche Zelle. Weiter bevorzugt wird die Ölsaat-Nutzpflanze aus der Gruppe gewählt, die aus Flachs (*Linum* sp.), Raps (*Brassica* sp.), Sojabohne (*Glycine* und *Soja* sp.), Sonnenblume (*Helianthus* sp.), Baumwolle (*Gossypium* sp.), Mais (*Zea mays*), Olive (*Olea* sp.), Saflor (*Carthamus* sp.), Kakao (*Theobroma cacao*), Erdnuss (*Arachis* sp.), Hanf, *Camelina*, *Crambe*, Ölpalme, Kokosnüssen, Erdnüssen, Sesamsaat, Kastorbohne, *Lesquerella*, Talgbaum, Sheanuss, Tungnuss, Kapok-Frucht, Mohnsamen, Jojobasamen und *Perilla* besteht.

**[0052]** Ebenfalls bevorzugt, ist die Wirtszelle ein Mikroorganismus. Weiter bevorzugt handelt es sich bei dem Mikroorganismus um ein Bakterium, einen Pilz oder Algen. Weiter bevorzugt wird er aus der Gruppe gewählt, die aus *Candida*, *Cryptococcus*, *Lipomyces*, *Rhodosporidium*, *Yarrowia* und *Schizochytrium* besteht.

**[0053]** Außerdem kann eine Wirtszelle gemäß der vorliegenden Erfindung auch eine tierische Zelle sein. Vorzugsweise ist die tierische Wirtszelle eine Wirtszelle aus einem Fisch oder eine daraus erhaltene Zelllinie. Weiter bevorzugt stammt die Fisch-Wirtszelle aus Hering, Lachs, Sardine, Rotbarsch, Aal, Karpfen, Forelle, Heilbutt, Makrele, Zander oder Tuna.

**[0054]** Im Allgemeinen werden die Regulierungsschritte bei der Herstellung von LCPUFAs, d. h. dem Weg der Biosynthese von langkettigen ungesättigten Fettsäuren, durch Membran-assoziierte Fettsäure-Elongase-Komplexe katalysiert. Pflanzen und die meisten anderen eukaryotischen Organismen besitzen ein spezialisiertes Elongasesystem für die Verlängerung von Fettsäuren über 18 C-Atome hinaus. Diese Elongasereaktionen haben mehrere wichtige Merkmale mit dem Fettsäuresynthase-Komplex (FAS) gemeinsam. Allerdings ist der Elongase-Komplex verschieden vom FAS-Komplex, da der Komplex im Cytosol lokalisiert ist und membrangebunden ist, ACP nicht beteiligt ist, und die Elongase 3-Keto-acyl-CoA-Synthase die Kondensation von Malonyl-CoA mit einem Acyl-Primer katalysiert. Der Elongase-Komplex besteht aus vier Komponenten mit unterschiedlichen katalytischen Funktionen, der Keto-acyl-CoA-Synthase (KCS, Kondensationsreaktion von Malonyl-CoA zu Acyl-CoA, Erzeugung einer um 2 C-Atome längeren Keto-acyl-CoA-Fettsäure), der Keto-acyl-CoA-Reduktase (KCR, Reduktion der 3-Ketogruppe zu einer 3-Hydroxygruppe), der Dehydratase (DH, Dehydratation führt zu einer delta-2-Enoyl-acyl-CoA-Fettsäure) und der Enoyl-CoA-Reduktase (ECR, Reduktion der Doppelbindung an Position 2, Freisetzung aus dem Komplex). Für die Herstellung von LCPUFAs, einschließlich ARA, EPA und/oder DHA, könnten die Elongations- und Desaturationsreaktionen essentiell sein. Höhere Pflanzen besitzen nicht den notwendigen Enzym-Satz, um LCPUFAs (4 oder mehr Doppelbindungen, 20 oder mehr C-Atome) herzustellen. Deshalb müssen die katalytischen Aktivitäten an die Pflanzen oder Pflanzenzellen verliehen werden. Kritische Schritte im Vorgang der LCPUFA-Biosynthese sind die Elongation von Fettsäuren von 18 auf 24 Kohlenstoffatome und die Desaturierung von Kohlenstoffatomen. Die Polynukleotide der vorliegenden Erfindung katalysieren überraschenderweise die Keto-Acyl-CoA-Synthase-, Keto-Acyl-CoA-Reduktase-, Dehydratase- und Enoyl-CoA-Reduktase-Reaktionen und katalysieren so die Elongation von Fettsäuren mit 18 Kohlenstoffatomen. Polynukleotide der vorliegenden Erfindung katalysieren überraschenderweise die De-

saturierung der 4., 5., 8., 9., 12. und 15. Fettsäure-Kohlenstoffatom-Bindungen. Durch Zuführen dieser Enzyme werden erhöhte Spiegel an PUFAs und LCPUFAs hergestellt.

**[0055]** Es versteht sich jedoch, dass abhängig von der Wirtszelle, weitere enzymatische Aktivitäten an die Wirtszellen vermittelt werden können, z. B. durch rekombinante Technologien. Folglich betrachtet die vorliegende Erfindung vorzugsweise eine Wirtszelle, welche zusätzlich zu dem Polynukleotid der vorliegenden Erfindung Polynukleotide umfasst, die solche Desaturasen und/oder Elongasen codieren, wie sie in Abhängigkeit von der gewählten Wirtszelle benötigt werden. Bei bevorzugten Desaturasen und/oder Elongasen, welche in der Wirtszelle vorhanden sein sollen, handelt es sich um wenigstens ein Enzym, gewählt aus der Gruppe, die aus folgendem besteht: d-4-Desaturase, d-5-Desaturase, d-5-Elongase, d-6-Desaturase, d12-Desaturase, d15-Desaturase,  $\omega$ 3-Desaturase und d-6-Elongase oder d9-Elongase. Besonders bevorzugt sind die bifunktionalen d12d15-Desaturasen d12d15Des(Ac) aus *Acanthamoeba castellanii* (WO2007042510), d12d15Des(Cp) aus *Claviceps purpurea* (WO2008006202) und d12d15Des(Lg)1 aus *Lotia gigantea* (WO2009016202), die d12-Desaturasen d12Des(Co) aus *Calendula officinalis* (WO200185968), d12Des(Lb) aus *Laccaria bicolor* (WO2009016202), d12Des(Mb) aus *Monosiga brevicollis* (WO2009016202), d12Des(Mg) aus *Mycosphaerella graminicola* (WO2009016202), d12Des(Nh) aus *Nectria haematococca* (WO2009016202), d12Des(Ol) aus *Ostreococcus lucimarinus* (WO2008040787), d12Des(Pb) aus *Phycomyces blakesleeanus* (WO2009016202), d12Des(Ps) aus *Phytophthora sojae* (WO2006100241) und d12Des(Tp) aus *Thalassiosira pseudonana* (WO2006069710), die d15-Desaturasen d15Des(Hr) aus *Helobdella robusta* (WO2009016202), d15Des(Mc) aus *Microcoleus chthonoplastes* (WO2009016202), d15Des(Mf) aus *Mycosphaerella fijiensis* (WO2009016202), d15Des(Mg) aus *Mycosphaerella graminicola* (WO2009016202) und d15Des(Nh)2 aus *Nectria haematococca* (WO2009016202), die d4-Desaturasen d4Des(Eg) aus *Euglena gracilis* (WO2004090123), d4Des(Tc) aus *Thraustochytrium* sp. (WO2002026946) und d4Des(Tp) aus *Thalassiosira pseudonana* (WO2006069710), die d5-Desaturasen d5Des(Ol)2 aus *Ostreococcus lucimarinus* (WO2008040787), d5Des(Pp) aus *Physcomitrella patens* (WO2004057001), d5Des(Pt) aus *Phaeodactylum tricornutum* (WO2002057465), d5Des(Tc) aus *Thraustochytrium* sp. (WO2002026946), d5Des(Tp) aus *Thalassiosira pseudonana* (WO2006069710) und die d6-Desaturasen d6Des(Cp) aus *Ceratodon purpureus* (WO2000075341), d6Des(Ol) aus *Ostreococcus lucimarinus* (WO2008040787), d6Des(Ot) aus *Ostreococcus tauri* (WO2006069710), d6Des(Pf) aus *Primula farinosa* (WO2003072784), d6Des(Pir)\_BO aus *Pythium irregulare* (WO2002026946), d6Des(Pir) aus *Pythium irregulare* (WO2002026946), d6Des(Plu) aus *Primula luteola* (WO2003072784), d6Des(Pp) aus *Physcomitrella patens* (WO200102591), d6Des(Pt) aus *Phaeodactylum tricornutum* (WO2002057465), d6Des(Pv) aus *Primula vialii* (WO2003072784) und d6Des(Tp) aus *Thalassiosira pseudonana* (WO2006069710), die d8-Desaturasen d8Des(Ac) aus *Acanthamoeba castellanii* (EP1790731), d8Des(Eg) aus *Euglena gracilis* (WO200034439) und d8Des(Pm) aus *Perkinsus marinus* (WO2007093776), die  $\omega$ 3-Desaturasen  $\omega$ 3Des(Pi) aus *Phytophthora infestans* (WO2005083053),  $\omega$ 3Des(Pir) aus *Pythium irregulare* (WO2008022963),  $\omega$ 3Des(Pir)2 aus *Pythium irregulare* (WO2008022963) und  $\omega$ 3Des(Ps) aus *Phytophthora sojae* (WO2006100241), die bifunktionalen d5d6-Elongasen d5d6Elo(Om)2 aus *Onchorynchus mykiss* (WO2005012316), d5d6Elo(Ta) aus *Thraustochytrium aureum* (WO2005012316) und d5d6Elo(Tc) aus *Thraustochytrium* sp. (WO2005012316), die d5-Elongasen d5Elo(At) aus *Arabidopsis thaliana* (WO2005012316), d5Elo(At)2 aus *Arabidopsis thaliana* (WO2005012316), d5Elo(Ci) aus *Ciona intestinalis* (WO2005012316), d5Elo(Ol) aus *Ostreococcus lucimarinus* (WO2008040787), d5Elo(Ot) aus *Ostreococcus tauri* (WO2005012316), d5Elo(Tp) aus *Thalassiosira pseudonana* (WO2005012316) und d5Elo(XI) aus *Xenopus laevis* (WO2005012316), die d6-Elongasen d6Elo(Ol) aus *Ostreococcus lucimarinus* (WO2008040787), d6Elo(Ot) aus *Ostreococcus tauri* (WO2005012316), d6Elo(Pi) aus *Phytophthora infestans* (WO2003064638), d6Elo(Pir) aus *Pythium irregulare* (WO2009016208), doElo(Pp) aus *Physcomitrella patens* (WO2001059128), d6Elo(Ps) aus *Phytophthora sojae* (WO2006100241), doElo(Ps)2 aus *Phytophthora sojae* (WO2006100241), doElo(Ps)3 aus *Phytophthora sojae* (WO2006100241), doElo(Pt) aus *Phaeodactylum tricornutum* (WO2005012316), doElo(Tc) aus *Thraustochytrium* sp. (WO2005012316) und doElo(Tp) aus *Thalassiosira pseudonana* (WO2005012316), die d9-Elongasen d9Elo(Ig) aus *Isochrysis galbana* (WO2002077213), d9Elo(Pm) aus *Perkinsus marinus* (WO2007093776) und d9Elo(Ro) aus *Rhizopus oryzae* (WO2009016208). Insbesondere wenn die Herstellung von ARA in höheren Pflanzen in Betracht gezogen wird, können die in der nachstehenden Tabelle 5 oder 6 genannten Enzyme (d. h. zusätzlich eine d6-Desaturase, d6-Elongase, d5-Desaturase und d12-Desaturase) oder Enzyme mit im Wesentlichen der gleichen Aktivität in einer Wirtszelle kombiniert werden. Wenn die Herstellung von EPA in höheren Pflanzen in Betracht gezogen wird, können die in der nachstehenden Tabelle 7 genannten Enzyme (d. h. zusätzlich eine d6-Desaturase, d6-Elongase, d5-Desaturase, d12-Desaturase,  $\omega$ -3-Desaturase und d15-Desaturase) oder Enzyme mit im Wesentlichen der gleichen Aktivität in einer Wirtszelle kombiniert werden. Wenn die Herstellung von DHA in höheren Pflanzen in Betracht gezogen wird, können die in der nachstehenden Tabelle 8 genannten Enzyme (d. h. zusätzlich eine d6-Desaturase, d6-Elongase, d5-Desaturase, d12-Desaturase,  $\omega$ -3-Desaturase, d15-Desaturase,

d5-Elongase und d4-Desaturase), oder Enzyme mit im Wesentlichen der gleichen Aktivität in einer Wirtszelle kombiniert werden.

**[0056]** Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls eine Zelle, vorzugsweise eine Wirtszelle, wie oben beschrieben, oder eine Zelle von einem nicht-menschlichen Organismus, die an anderer Stelle hierin spezifiziert wird, wobei die Zelle ein Polynukleotid umfasst, das aus dem Polynukleotid der vorliegenden Erfindung durch eine Punktmutation, eine Verkürzung, eine Inversion, eine Deletion, eine Addition, eine Substitution sowie homologe Rekombination erhalten wird. Wie man derartige Modifikationen an einem Polynukleotid ausführt, ist dem Fachmann auf dem Gebiet allgemein bekannt und ist an anderer Stelle in dieser Patentbeschreibung ausführlich beschrieben worden.

**[0057]** Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids, codiert von einem Polynukleotid der vorliegenden Erfindung, das folgendes umfasst

- a) Kultivieren der Wirtszelle der Erfindung unter Bedingungen, welche die Herstellung des Polypeptids gestatten; und
- b) Gewinnen des Polypeptids aus der Wirtszelle von Schritt a).

**[0058]** Geeignete Bedingungen, welche die Expression des von der Wirtszelle enthaltenen Polynukleotids der Erfindung gestatten, hängen von der Wirtszelle sowie der Expressions-Steuerungssequenz ab, die zur Regelung der Expression des Polynukleotids verwendet wird. Diese Bedingungen und wie man sie auswählt, sind dem Fachmann auf dem Gebiet sehr genau bekannt. Das exprimierte Polypeptid kann zum Beispiel durch alle herkömmliche Reinigungstechniken, einschließlich Affinitätschromatographie, Größenausschlusschromatographie, Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) und Präzipitationstechniken, einschließlich Antikörperpräzipitation, gewonnen werden. Es versteht sich, dass das Verfahren – obwohl bevorzugt – nicht notwendigerweise eine im Wesentlichen reine Präparation des Polypeptids ergeben kann. Es versteht sich, dass abhängig von der Wirtszelle, welche für das oben erwähnte Verfahren verwendet wird, die davon hergestellten Polypeptide posttranslational modifiziert oder anderweitig prozessiert werden können.

**[0059]** Die vorliegende Erfindung beinhaltet ein Polypeptid, das von dem Polynukleotid der vorliegenden Erfindung codiert wird oder das durch das oben erwähnte Verfahren erhältlich ist.

**[0060]** Der Begriff "Polypeptid", wie hierin verwendet, schließt im Wesentlichen gereinigte Polypeptide oder Polypeptidpräparationen ein, die zusätzlich andere Proteine umfassen. Ferner bezieht sich der Begriff auch auf die Fusionsproteine oder Polypeptidfragmente, die zumindest teilweise von dem oben genannten Polynukleotid der vorliegenden Erfindung codiert werden. Darüber hinaus schließt er chemische modifizierte Polypeptide ein. Derartige Modifikationen können künstliche Modifikationen oder natürlich vorkommende Modifikationen, wie Phosphorylierung, Glykosylierung, Myristylierung und dergleichen, sein (Übersicht in Mann 2003, Nat. Biotechnol. 21, 255–261, Übersicht mit Fokus auf Pflanzen in Huber 2004, Curr. Opin. Plant Biol. 7, 318–322). Gegenwärtig sind mehr als 300 posttranslationale Modifikationen bekannt (siehe vollständige ABFRC Delta-Massen-Liste unter <http://www.abrf.org/index.cfm/dm.home>). Das Polypeptid der vorliegenden Erfindung soll die oben dargelegte Desaturase-, Keto-Acyl-CoA-Synthase-, Keto-Acyl-CoA-Reduktase-, Dehydratase- oder Enoyl-CoA-Reduktase-Aktivität aufzeigen.

**[0061]** Die vorliegende Erfindung beinhaltet ferner einen Antikörper, welcher das Polypeptid der Erfindung spezifisch erkennt.

**[0062]** Antikörper gegen die Polypeptide der Erfindung können durch allgemein bekannte Verfahren unter Verwendung eines gereinigten Polypeptids gemäß der Erfindung oder eines geeigneten, daraus abgeleiteten Fragments als Antigen hergestellt werden. Ein Fragment, welches als ein Antigen geeignet ist, kann durch Antigenizitäts-ermittelnde Algorithmen, die im Fachgebiet allgemein bekannt sind, identifiziert werden. Derartige Fragmente können entweder aus dem Polypeptid der Erfindung durch proteolytischen Verdau erhalten werden oder können ein synthetisches Peptid sein. Vorzugsweise ist der Antikörper der vorliegenden Erfindung ein monoklonaler Antikörper, ein polyklonaler Antikörper, ein Einzelkettenantikörper, ein chimärisierter Antikörper oder ein Fragment von beliebigen dieser Antikörper, wie Fab-, Fv- oder scFv-Fragmente, etc.. Ebenfalls als Antikörper durch die vorliegende Erfindung inbegriffen sind bispezifische Antikörper, synthetische Antikörper oder chemisch modifizierte Derivate von beliebigen der oben genannten Antikörper. Der Antikörper der vorliegenden Erfindung soll spezifisch an das Polypeptid der Erfindung binden (d. h. er zeigt keine signifikante Kreuzreaktion mit anderen Polypeptiden oder Peptiden). Die spezifische Bindung kann durch verschiedene allgemein bekannte Techniken getestet werden. Antikörper oder Fragmente davon können durch Anwendung von Verfahren erhalten werden, welche z. B. in Harlow und Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH

Press, Cold Spring Harbor, 1988, beschrieben sind. Monoklonale Antikörper können durch die Techniken hergestellt werden, welche ursprünglich beschrieben wurden in Köhler 1975, Nature 256, 495, und Galfré 1981, Meth. Enzymol. 73, 3, welche die Fusion von Maus-Myelomzellen mit Milzzellen, die aus immunisierten Säugern abgeleitet sind, umfassen. Die Antikörper können zum Beispiel für die Immunpräzipitation, Immunlokalisierung oder Reinigung (z. B. durch Affinitätschromatographie) der Polypeptide der Erfindung sowie für die Überwachung des Vorhandenseins der Varianten-Polypeptide, zum Beispiel in rekombinanten Organismen, und für die Identifizierung von Proteinen oder Verbindungen, welche mit den Proteinen gemäß der Erfindung wechselwirken, verwendet werden.

**[0063]** Die Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung lassen sich außerdem zum Identifizieren des Vorhandenseins oder Abwesens der Polypeptide der vorliegenden Erfindung einsetzen. Vorzugsweise verwendet man den Antikörper, wie hier bereits an anderer Stelle ausgeführt, zum Identifizieren nichthumaner transgener Organismen und bevorzugt transgener Pflanzen, die die Polypeptide der vorliegenden Erfindung enthalten. Zu diesem Zweck kann der Antikörper in Form eines Kits bereitgestellt werden, welches die Identifizierung nichthumaner transgener Organismen und vorzugsweise transgener Pflanzen, die die Polypeptide der vorliegenden Erfindung enthalten, gestattet. Das Kit kann zusätzlich zum Antikörper der vorliegenden Erfindung weiterhin ein Nachweismittel zum Nachweis eines Komplexes des erfindungsgemäßen Antikörpers und des erfindungsgemäßen Polypeptides enthalten.

**[0064]** Darüber hinaus betrachtet die vorliegende Erfindung einen nicht-menschlichen transgenen Organismus, der das Polynukleotid oder den Vektor der vorliegenden Erfindung umfasst.

**[0065]** Vorzugsweise handelt es sich bei dem nicht-menschlichen transgenen Organismus um eine Pflanze, einen Pflanzenteil oder Pflanzensamen. Bevorzugte Pflanzen, die zur Einbringung des Polynukleotids oder des Vektors der Erfindung verwendet werden sollen, sind Pflanzen, welche zum Synthetisieren von Fettsäuren in der Lage sind, wie alle dikotylen oder monokotylen Pflanzen, Algen oder Moose. Es versteht sich, dass Wirtszellen, die aus einer Pflanze abgeleitet sind, ebenfalls für die Erzeugung einer Pflanze gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden können. Bevorzugte Pflanzen sind ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzenfamilien Adelotheceae, Anacardiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Betulaceae, Boraginaceae, Brassicaceae, Bromeliaceae, Caricaceae, Cannabaceae, Convolvulaceae, Chenopodiaceae, Crypthecodiniaceae, Cucurbitaceae, Ditrachaceae, Elaeagnaceae, Ericaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Geraniaceae, Gramineae, Juglandaceae, Lauraceae, Leguminosae, Linaceae, Prasinophyceae oder Gemüsepflanzen oder Zierpflanzen, wie Tagetes. Beispiele, welche genannt werden können, sind die folgenden Pflanzen, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus: Adelotheceae, wie die Gattungen Physcomitrella, wie die Gattung und Spezies Physcomitrella patens, Anacardiaceae, wie die Gattungen Pistacia, Mangifera, Anacardium, zum Beispiel die Gattung und Spezies Pistacia vera [Pistazie], Mangifer 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 [Garten-Ringelblume], Carthamus tinctorius [Saflor], Centaurea cyanus [Kornblume], Cichorium intybus [Chicoree], Cynara scolymus [Artischoke], 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 [Salat], Tagetes lucida, Tagetes erecta oder Tagetes tenuifolia [„African“- oder „French“-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, Melanosinapis, Sinapis, Arabidopsis, zum Beispiel die Gattungen und Spezies Brassica napus, Brassica rapa ssp. [Ölsamenraps], Sinapis arvensis, Brassica juncea, Brassica juncea var. juncea, Brassica juncea var. crispifolia, Brassica juncea var. foliosa, Brassica nigra, Brassica sinapioides, Melanosinapis communis [Senf], Brassica oleracea [Futterrübe] oder Arabidopsis thaliana, Bromeliaceae, wie die Gattungen Anana, Bromelia (Ananas), zum Beispiel die Gattungen und Spezies Anana comosus, Ananas ananas oder Bromelia comosa [Ananas], Caricaceae, wie die Gattung Carica, wie die Gattung und Spezies Carica papaya [Papaya], 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], Crypthecodiniaceae, wie die Gattung Crypthecodinium, zum Beispiel die Gattung und Spezies Crypthecodinium cohnii, Cucurbitaceae, wie die Gattung Cucurbita, zum Beispiel die Gattungen und Spezies Cucurbita maxima, Cu-

curbita mixta, Cucurbita pepo oder Cucurbita moschata [Kürbis/Gartenkürbis], Cymbellaceae, wie die Gattungen Amphora, Cymbella, Okedenia, Phaeodactylum, Reimeria, zum Beispiel die Gattung und Spezies Phaeodactylum tricornerum, 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 heterophyllus, 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 crispissimum, Ditrichum difficile, Ditrichum falcifolium, Ditrichum flexicaule, Ditrichum giganteum, Ditrichum heteromallum, Ditrichum lineare, Ditrichum lineare, Ditrichum montanum, Ditrichum montanum, Ditrichum pallidum, Ditrichum punctulatum, Ditrichum pusillum, Ditrichum pusillum var. tortile, Ditrichum rhynchostegium, Ditrichum schimperi, Ditrichum tortile, Distichium capillaceum, Distichium hagenii, Distichium inclinatum, Distichium macounii, Eccremidium floridanum, Eccremidium whiteleggei, Lophidion strictus, Pleuridium acuminatum, Pleuridium alternifolium, Pleuridium holdridgei, Pleuridium mexicanum, 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 [Maniok] oder Ricinus communis [Rizinus], Fabaceae, wie die Gattungen Pisum, Albizia, Cathormion, Feuillea, Inga, Pithecolobium, Acacia, Mimosa, Medicago, Glycine, Dolichos, Phaseolus, Soja, 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, Albizzia berteriana, Cathormion berteriana, Feuillea berteriana, Inga fragrans, Pithecolobium berterianum, Pithecolobium fragrans, Pithecolobium berterianum, Pseudalbizzia berteriana, Acacia julibrissin, Acacia nemu, Albizia nemu, Feuillea julibrissin, Mimosa julibrissin, Mimosa speciosa, Sericanrda 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, Physcomitrella, 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 rubrisetus, 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 rubriseta, 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], Lythraeae, 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 [Cayenne-Pfeffer], 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 byzantina, Avena fatua var. sativa, Avena hybrida [Hafer], Sorghum bicolor, Sorghum halepense, Sorghum saccharatum, Sorghum vulgare, Andropogon drummondii, Holcus bicolor, Holcus sorghum, Sorghum aethiopicum, Sorghum arundinaceum, Sorghum caffrorum, Sorghum cerneum, Sorghum dochna, Sorghum drummondii, Sorghum durra, Sorghum guineense, Sorghum lanceolatum, Sorghum nervosum, Sorghum saccharatum, Sorghum subglabrescens, Sorghum verticilliflorum, Sorghum vulgare, Holcus halepensis, Sorghum miliaceum, Panicum miliaceum [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 [Chilischote], Capsicum annuum [Paprika], Nicotiana tabacum, Nicotiana glauca, 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]. Insbesondere sind bevorzugte Pflanzen, die als transgene Pflanzen gemäß der vorliegenden Erfindung zu verwenden sind, Ölfrucht-Nutzpflanzen, welche große Mengen an Lipidverbindungen umfassen, wie Erdnuss, Ölsamenraps, Canola, Sonnenblume, Saflor, Mohn, Senf, Hanf, Castoröl-Pflanze bzw. Rizinus, Olive, Sesam, Calendula, Punica, Nachtkerze, Königskerze, Distel, Wildrosen, Haselnuss, Mandel, Macadamia, Avokado, Lorbeer, Kürbis/Gartenkürbis, Leinsamen, Sojabohne, Pistazien, Borretsch, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss, Walnuss) oder Nutzpflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Baumwolle, Cassava, Pfeffer bzw. Paprika, Tagetes, Nachtschattengewächse wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Spezies, Erbse, Alfalfa oder buschartige Pflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Spezies und mehrjährige Gräser und Futterpflanzen. Bevorzugte Pflanzen gemäß der Erfindung sind Ölnutzpflanzen, wie Erdnuss, Ölsamenraps, Canola, Sonnenblume, Saflor, Mohn, Senf, Hanf, Castoröl-Pflanze, Olive, Calendula, Punica, Nachtkerze, Kürbis/Gartenkürbis, Leinsamen, Sojabohne, Borretsch, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss). Besonders bevorzugt werden Sonnenblume, Saflor, Tabak, Königskerze, Sesam, Baumwolle, Kürbis/Gartenkürbis, Mohn, Nachtkerze, Walnuss, Leinsamen, Hanf, Distel oder Saflor. Ganz besonders bevorzugte Pflanzen sind Pflanzen, wie Saflor, Sonnenblume, Mohn, Nachtkerze, Walnuss, Leinsamen oder Hanf.

**[0066]** Bevorzugte Moose sind Physcomitrella oder Ceratodon. Bevorzugte Algen sind Isochrysis, Mantoniella, Ostreococcus oder Cryptocodinium, und Algen/Diatomeen, wie Phaeodactylum oder Thraustochytrium. Weiter bevorzugt sind die Algen oder Moose gewählt aus der Gruppe, bestehend aus: Shewanella, Physcomitrella, Thraustochytrium, Fusarium, Phytophthora, Ceratodon, Isochrysis, Aleurita, Muscarioides, Mortierella

la, Phaeodactylum, Cryptothecodinium, spezifisch aus den Gattungen und Spezies Thalassiosira pseudonona, Euglena gracilis, Physcomitrella patens, Phytophthora infestans, Fusarium gramineum, Cryptocodium cohnii, Ceratodon purpureus, Isochrysis galbana, Aleurita farinosa, Thraustochytrium sp., Muscarioides vialii, Mortierella alpina, Phaeodactylum tricornutum oder Caenorhabditis elegans oder, besonders vorteilhaft, Phytophthora infestans, Thalassiosira pseudonona und Cryptocodium cohnii.

**[0067]** Transgene Pflanzen können durch Transformationstechniken erhalten werden, wie an anderer Stelle in dieser Beschreibung. Vorzugsweise können transgene Pflanzen durch T-DNA-vermittelte Transformation erhalten werden. Solche Vektorsysteme sind in der Regel dadurch gekennzeichnet, dass sie mindestens die vir-Gene, welche für die Agrobacterium-vermittelte Transformation erforderlich sind, und die Sequenzen, welche die T-DNA begrenzen (T-DNA-Border), enthalten. Geeignete Vektoren sind andernorts in der Beschreibung in Einzelheiten beschrieben.

**[0068]** Ebenfalls inbegriffen sind transgene nicht-menschliche Tiere, die den Vektor oder das Polynukleotid der vorliegenden Erfindung umfassen. Bevorzugte nicht-menschliche transgene Tiere, die von der vorliegenden Erfindung in Betracht gezogen werden, sind Fische, wie Hering, Lachs, Sardine, Rotbarsch, Aal, Karpfen, Forelle, Heilbutt, Makrele, Zander oder Tuna.

**[0069]** Es versteht sich jedoch, dass, abhängig von dem oben spezifizierten nicht-menschlichen transgenen Organismus, weitere enzymatische Aktivitäten an den Organismus, z. B. durch rekombinante Technologien, vermittelt werden können. Folglich betrachtet die vorliegende Erfindung vorzugsweise einen oben spezifizierten, nicht-menschlichen transgenen Organismus, der zusätzlich zu dem Polynukleotid der vorliegenden Erfindung Polynukleotide umfasst, welche derartige Desaturasen und/oder Elongasen codieren, wie sie in Abhängigkeit von der gewählten Wirtszelle erforderlich sind. Bei bevorzugten Desaturasen und/oder Elongasen, welche in dem Organismus vorhanden sein sollen, handelt es sich um wenigstens ein Enzym, gewählt aus der Gruppe von Desaturasen und/oder Elongasen oder den Kombinationen, welche spezifisch an anderer Stelle in dieser Beschreibung aufgeführt sind (siehe oben und die Tabellen 5, 6 und 7).

**[0070]** Außerdem schließt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von mehrfach-ungesättigten Fettsäuren ein, das folgendes umfasst:

- a) Kultivieren der Wirtszelle der Erfindung unter Bedingungen, welche die Herstellung von mehrfach-ungesättigten Fettsäuren in der Wirtszelle gestatten; und
- b) Gewinnen der mehrfach-ungesättigten Fettsäuren aus der Wirtszelle.

**[0071]** Der Begriff "mehrfach-ungesättigte Fettsäuren (PUFA)", wie hierin verwendet, bezieht sich auf Fettsäuren, welche mindestens zwei, vorzugsweise drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen umfassen. Darüber hinaus versteht es sich, dass solche Fettsäuren vorzugsweise 18 bis 24 Kohlenstoffatome in der Fettsäurekette umfassen. Weiter bevorzugt bedeutet der Begriff langkettige PUFA (LCPUFA) mit 20 bis 24 Kohlenstoffatomen in der Fettsäurekette. Bevorzugte ungesättigte Fettsäuren im Sinn der vorliegenden Erfindung sind aus der Gruppe gewählt, bestehend aus DGLA 20:3 (8, 11, 14), ARA 20:4 (5, 8, 11, 14), iARA 20:4 (8, 11, 14, 17), EPA 20:5 (5, 8, 11, 14, 17), DPA 22:5 (4,7,10,13,16), DHA 22:6 (4,7,10,13,16,19), 20:4 (8, 11, 14, 17), weiter bevorzugt Arachidonsäure (ARA) 20:4 (5, 8, 11, 14), Eicosapentaensäure (EPA) 20:5 (5, 8, 11, 14, 17), und Docosahexaensäure (DHA) 22:6 (4, 7, 10, 13, 16, 19). Somit versteht es sich, dass die von der vorliegenden Erfindung bereitgestellten Verfahren, am meisten bevorzugt, die Herstellung von ARA, EPA oder DHA betreffen. Außerdem sind ebenfalls die Intermediate von LCPUFA inbegriffen, welche während der Synthese vorkommen. Solche Intermediate werden vorzugsweise durch die Desaturase-, Keto-Acyl-CoA-Synthase-, Keto-Acyl-CoA-Reduktase-, Dehydratase- oder Enoyl-CoA-Reduktase-Aktivität des Polypeptids der vorliegenden Erfindung aus Substraten gebildet. Vorzugsweise schließen Substrate LA 18:2 (9, 12), GLA 18:3 (6, 9, 12), DGLA 20:3 (8, 11, 14), ARA 20:4 (5, 8, 11, 14), Eicosadiensäure 20:2 (11, 14), Eicosatetraensäure 20:4 (8, 11, 14, 17), Eicosapentaensäure 20:5 (5, 8, 11, 14, 17) ein.

**[0072]** Der Begriff "Kultivieren", wie hierin verwendet, bedeutet Halten und Wachsenlassen der Wirtszellen unter Kulturbedingungen, welche den Zellen gestatten, die mehrfach-ungesättigte Fettsäure, d. h. die oben erwähnte PUFA und/oder LCPUFA, herzustellen. Dies impliziert, dass das Polynukleotid der vorliegenden Erfindung in der Wirtszelle exprimiert wird, so dass die Desaturase-, Keto-Acyl-CoA-Synthase-, Keto-Acyl-CoA-Reduktase-, Dehydratase- oder Enoyl-CoA-Reduktase-Aktivität vorhanden ist. Geeignete Kulturbedingungen zur Kultivierung der Wirtszelle sind nachstehend ausführlicher beschrieben.

**[0073]** Der Begriff "Gewinnen", wie hierin verwendet, beinhaltet die Bereitstellung der Zellkultur, welche die Wirtszellen und das Kulturmedium einschließt, sowie die Bereitstellung von gereinigten oder teilweise gerei-

nigten Präparationen davon, welche die mehrfach-ungesättigten Fettsäuren, vorzugsweise ARA, EPA, DHA, in freier oder in -CoA-gebundener Form, als Membranphospholipide oder als Triacylglyceridester, umfassen. Weiter bevorzugt sollen die PUFA und LCPUFA als Triglyceridester, z. B. in Form eines Öls, gewonnen werden. Mehr Einzelheiten bezüglich Reinigungstechniken können andernorts hierin nachstehend gefunden werden.

**[0074]** Die im Verfahren der Erfindung zu verwendenden Wirtszellen werden auf die Weise, mit der der Fachmann vertraut ist, abhängig vom Wirtsorganismus wachsen gelassen oder kultiviert. In der Regel werden Wirtszellen in einem flüssigen Medium, das eine Kohlenstoffquelle, üblicherweise in der Form von Zuckern, eine Stickstoffquelle, üblicherweise in der Form von organischen Stickstoffquellen, wie Hefeextrakt oder Salzen, wie Ammoniumsulfat, Spurenelemente, wie Salze von Eisen, Mangan und Magnesium, und, falls zutreffend, Vitamine umfasst, bei Temperaturen zwischen 0°C und 100°C, vorzugsweise zwischen 10°C und 60°C, unter Sauerstoff oder anaerober Atmosphäre, abhängig vom Typ des Organismus, wachsen gelassen. Der pH-Wert des flüssigen Mediums kann entweder konstant gehalten werden, d. h. während der Kulturdauer reguliert werden, oder nicht. Die Kulturen können satzweise, halbsatzweise oder kontinuierlich wachsen gelassen werden. Nährstoffe können am Beginn der Fermentierung bereitgestellt oder halbkontinuierlich oder kontinuierlich verabreicht werden: Die erzeugten PUFA oder LCPUFA können aus den Wirtszellen wie oben beschrieben durch dem Fachmann bekannte Verfahren, z. B. durch Extraktion, Destillation, Kristallisation, falls zutreffend Präzipitation mit Salz, und/oder Chromatographie, isoliert werden. Es könnte erforderlich sein, die Wirtszellen vor der Reinigung aufzubrechen. Zu diesem Zweck können die Wirtszellen zuvor aufgebrochen werden. Das zu verwendende Kulturmedium muss in geeigneter Weise den Anforderungen der betreffenden Wirtszellen genügen. Beschreibungen von Kulturmedien für verschiedene Mikroorganismen, welche als Wirtszellen gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, können in dem Lehrbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D. C., USA, 1981) gefunden werden. Kulturmedien können ebenfalls von diversen kommerziellen Anbietern erhalten werden. Alle Medienkomponenten werden sterilisiert, entweder durch Wärme oder durch Filtersterilisation. Alle Medienkomponenten können am Beginn der Kultivierung vorhanden sein oder kontinuierlich oder satzweise zugegeben werden, wie gewünscht. Wenn das Polynukleotid oder der Vektor der Erfindung, welches/r in die Wirtszelle eingebracht worden ist, ferner einen exprimierbaren Selektionsmarker, wie ein Antibiotikumresistenzgen, umfasst, könnte es notwendig sein, der Kultur ein Selektionsmittel, wie ein Antibiotikum, zuzugeben, um die Stabilität des eingebrachten Polynukleotids aufrecht zu erhalten. Die Kultur wird fortgesetzt, bis die Bildung des gewünschten Produkts am Maximum ist. Dies wird normalerweise innerhalb von 10 bis 160 Stunden erreicht. Die Fermentationsnährlösungen können direkt verwendet werden oder können weiter verarbeitet werden. Die Biomasse kann, gemäß der Forderung, vollständig oder teilweise aus der Fermentationsnährlösung durch Trennverfahren, wie zum Beispiel Zentrifugation, Filtration, Dekantieren oder eine Kombination dieser Verfahren, entfernt werden oder vollständig in der Nährlösung gelassen werden. Die durch das Verfahren der Erfindung erhaltenen Fettsäurepräparationen, z. B. Öle, welche die gewünschte PUFA oder LCPUFA als Triglyceridester umfassen, sind ebenfalls als Ausgangsmaterial für die chemische Synthese weiterer Produkte von Interesse geeignet. Zum Beispiel können sie in Kombination miteinander oder allein für die Herstellung von pharmazeutischen oder kosmetischen Zusammensetzungen, Nahrungsmitteln oder Tierfutter verwendet werden. Chemisch reine Triglyceride, welche die gewünschte PUFA oder LCPUFA umfassen, können ebenfalls durch die oben beschriebenen Verfahren hergestellt werden. Zu diesem Zweck werden die Fettsäurepräparationen durch Extraktion, Destillation, Kristallisation, Chromatographie oder Kombinationen dieser Verfahren weiter gereinigt. Um die Fettsäurereste aus den Triglyceriden freizusetzen, kann auch eine Hydrolyse erforderlich sein. Die chemisch reinen Triglyceride oder freien Fettsäuren sind insbesondere für Anwendungen in der Lebensmittelindustrie oder für kosmetische und pharmakologische Zusammensetzungen geeignet.

**[0075]** Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von mehrfach-ungesättigten Fettsäuren, das folgendes umfasst:

- a) Kultivieren des nicht-menschlichen transgenen Organismus der Erfindung unter Bedingungen, welche die Herstellung von mehrfach-ungesättigten Fettsäuren in der Wirtszelle gestatten; und
- b) Gewinnen der mehrfach-ungesättigten Fettsäuren aus dem nicht-menschlichen transgenen Organismus.

**[0076]** Ferner folgt aus dem oben genannten, dass ebenfalls ein Verfahren zur Herstellung einer Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung von der vorliegenden Erfindung betrachtet wird, umfassend die Schritte von einem beliebigen der vorangehend erwähnten Verfahren und den weiteren Schritt des Formulierens von PUFA oder LCPUFA als Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung. Vorzugsweise soll die Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung für Futter, Nahrungsmittel, Kosmetika oder Medikamente verwendet werden. Folglich soll die Formulierung der PUFA oder LCPUFA gemäß den "Gute-Herstellungs-Praxis"- bzw. GMP-Standards für die individuell beabsichtigten Produkten durchgeführt werden. Zum Beispiel kann ein Öl aus Pflanzensamen mittels einer Ölmühle erhalten werden. Allerdings kann, aus Gründen der Produktsicherheit, eine Sterilisierung

gemäß des betreffenden GMP-Standards erforderlich sein. Ähnliche Standards werden für Lipid- oder Fettsäurezusammensetzungen gelten, die in kosmetischen oder pharmazeutischen Zusammensetzungen anzuwenden sind. Alle diese Maßnahmen zur Formulierung von Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzungen als Produkte sind bei der oben genannten Herstellung inbegriffen.

**[0077]** Zur Herstellung von ARA wird vorzugsweise in Betracht gezogen, eine erfindungsgemäße Wirtszelle oder einen nichthumanen transgenen Organismus, welcher eine Kombination der Polynukleotide der vorliegenden Erfindung enthält, zu kultivieren. Vorzugsweise wird eine Kombination der erfindungsgemäßen Nukleotide in Betracht gezogen, die für eine d12-Desaturase, eine d6-Desaturase, eine d6-Elongase, eine d5-Desaturase, KCR, DH und ECR kodiert (siehe auch Tabelle 6 in den angefügten Beispielen).

**[0078]** Für die Herstellung von ARA wird alternativ dazu, jedoch ebenfalls bevorzugt, die Kultivierung einer erfindungsgemäßen Wirtszelle oder eines nichthumanen transgenen Organismus, welcher eine Kombination der Polynukleotide der vorliegenden Erfindung enthält, in Betracht gezogen. Vorzugsweise wird eine Kombination der erfindungsgemäßen Polynukleotide in Betracht gezogen, die für eine d12-Desaturase, eine d9-Elongase, eine d8-Desaturase, eine d6-Elongase, eine d5-Desaturase, KCR, DH und ECR kodiert (siehe auch Tabelle 7 in den angefügten Beispielen).

**[0079]** Für die Produktion von EPA wird vorzugsweise die Kultivierung einer erfindungsgemäßen Wirtszelle oder eines nichthumanen transgenen Organismus, welcher eine Kombination von Polynukleotiden der vorliegenden Erfindung enthält, in Betracht gezogen. Vorzugsweise wird eine Kombination der Polynukleotide, die bevorzugt für die oben angeführte ARA-Produktion eingesetzt werden, zusammen mit einem Polynukleotid der vorliegenden Erfindung, welches für eine d15-Desaturase kodiert, und einem Polynukleotid der vorliegenden Erfindung, welches für eine Omega-3-Desaturase kodiert, angewendet (d. h. eine Kombination der Aktivitäten, auf die entweder in Tabelle 6 zusammen mit Tabelle 8 oder in Tabelle 7 zusammen mit Tabelle 8 Bezug genommen wird; siehe auch Tabelle 8 in den angefügten Beispielen).

**[0080]** Für die Herstellung von DHA wird vorzugsweise die Kultivierung einer erfindungsgemäßen Wirtszelle oder eines nichthumanen transgenen Organismus, welcher eine Kombination von Polynukleotiden der vorliegenden Erfindung umfasst, in Betracht gezogen. Vorzugsweise verwendet man eine Kombination der Polynukleotide, die bevorzugt für die wie oben angegebene EPA-Produktion eingesetzt werden, zusammen mit einem Polynukleotid der vorliegenden Erfindung, welches für eine d5-Elongase kodiert, und einem Polynukleotid der vorliegenden Erfindung, welches für eine d4-Desaturase kodiert (d. h. eine Kombination der Aktivitäten, auf die entweder in Tabelle 6 und Tabelle 8 zusammen mit Tabelle 9 oder in Tabelle 7 und Tabelle 8 zusammen mit Tabelle 9 Bezug genommen wird; siehe auch Tabelle 9 in den angefügten Beispielen).

**[0081]** Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls ein Öl, umfassend eine mehrfach-ungesättigte Fettsäure, die durch die oben genannten Verfahren erhältlich ist.

**[0082]** Der Begriff "Öl" bezieht sich auf ein Fettsäuregemisch, umfassend ungesättigte und/oder gesättigte Fettsäuren, welche mit Triglyceriden verestert sind. Vorzugsweise umfassen die Triglyceride im Öl der Erfindung PUFA oder LCPUFA, wie oben aufgeführt. Die Menge an verestertem PUFA und/oder LCPUFA beträgt vorzugsweise ungefähr 30%, wobei ein Gehalt von 50% bevorzugt ist, und ein Gehalt von 60%, 70%, 80% oder mehr noch weiter bevorzugt ist. Das Öl kann ferner freie Fettsäuren, vorzugsweise die oben genannten PUFA und LCPUFA, umfassen. Für die Analyse kann der Fettsäuregehalt z. B. durch GC-Analyse nach Umwandeln der Fettsäuren in die Methylester durch Umesterung bestimmt werden. Der Gehalt der verschiedenen Fettsäuren in dem Öl oder Fett kann, insbesondere in Abhängigkeit von der Quelle, variieren. Das Öl soll jedoch eine nicht-natürlich vorkommende Zusammensetzung in Hinsicht auf PUFA- und/oder LCPUFA-Zusammensetzung und -Gehalt aufweisen. Es ist bekannt, dass die meisten Fettsäuren in Pflanzenöl verestert in Triacylglyceriden vorliegen. Dementsprechend liegen in dem erfindungsgemäßen Öl die PUFAs und LCPUFAs vorzugsweise ebenfalls in veresteter Form in den Triacylglyceriden vor. Es versteht sich, dass eine solche einzigartige Ölzusammensetzung und das einzigartige Veresterungsmuster von PUFA und LCPUFA in den Triglyceriden des Öls nur durch Anwenden der oben angegebenen Verfahren der vorliegenden Erfindung erhältlich sein soll. Darüber hinaus kann das Öl der Erfindung auch andere molekulare Spezies umfassen. Im Speziellen kann es geringfügige Verunreinigungen mit dem Polynukleotid oder Vektor der Erfindung umfassen. Derartige Verunreinigungen können jedoch nur durch hoch empfindliche Techniken, wie PCR, nachgewiesen werden.

**[0083]** Alle in dieser Beschreibung angeführten Referenzen sind hierin durch den Bezug eingeschlossen, und zwar sowohl bezüglich ihres gesamten Offenbarungsgehaltes als auch des Offenbarungsgehaltes, welcher in dieser Beschreibung spezifisch erwähnt ist.

#### FIGUREN

**[0084]** Die Figur zeigt die Herstellung von d4/d5/d6/d15-entsättigten Fettsäuren in mit dem pYes-pd4Des(Mb)-, pYes-pd5Des\_c738(No)- oder pYes-pd6Des\_c2410(No)-Konstrukt transformierter Hefe. Gezeigt ist das Fettsäurespektrum von mit verschiedenen Fettsäuren gefütterter transgener Hefe. A: Kontrolle-pYes gefüttert mit 22:4n-6, B: pYes gefüttert mit 22:5n-3, C: pYes-pd4Des(Mb) gefüttert mit 22:4n-6, D: pYes-pd4Des(Mb) gefüttert mit 22:5n-3, E: pYes-Kontrolle gefüttert mit 20:3n-6, F: pYes-Kontrolle gefüttert mit 20:4n-3, G: pYes-pd5Des\_c738(No) gefüttert mit 20:3n-6, H: pd5Des\_c738(No) gefüttert mit 20:4n-3, I: Kontrolle pYes gefüttert mit 18:2n-6, J: pYes-Kontrolle gefüttert mit 18:3n-3, K: pYes-pd6Des\_c2410(No) gefüttert mit 18:2n-6 und L: pYes-pd6Des\_c2410(No) gefüttert mit 18:3n-3.

**[0085]** Die Erfindung wird nun durch die folgenden Beispiele veranschaulicht, welche jedoch nicht als einschränkend ausgelegt werden sollten.

#### BEISPIELE

##### Beispiel 1: Allgemeine Klonierungsverfahren

**[0086]** Die Klonierungsverfahren, wie zum Beispiel die Verwendung von Restriktionsendonukleasen zum Schneiden von doppelsträngiger DNA an spezifischen Stellen, Agarosegelelektrophoresen, die Aufreinigung von DNA-Fragmenten, der Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose- und Nylonmembranen, das Legieren von DNA-Fragmenten, die Transformation von *E. coli*-Zellen und die Kultivierung von Bakterien wurden wie in Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87965-309-6) beschrieben durchgeführt.

##### Beispiel 2: Sequenzanalyse von rekombinanter DNA

**[0087]** Das Sequenzieren rekombinanter DNA-Moleküle wurde mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer (Applied Biosystems Inc, USA) unter Anwendung des Sanger-Verfahrens (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463–5467) durchgeführt. Durch die Polymerasekettenreaktion erhaltene Fragmente enthaltende Expressionskonstrukte wurden sequenziert, um die Korrektheit der aus Promotor, zu exprimierenden Nukleinsäuremolekül und Terminator bestehenden Expressionskassetten zu bestätigen, um aus der Handhabung der DNA während der Klonierung herrührende Mutationen, z. B. aufgrund nicht korrekter Primer, Mutationen aufgrund einer UV-Licht-Exposition oder Polymerasenfehler zu vermeiden.

##### Beispiel 3: Klonierung von Hefeexpressionskonstrukten durch homologe Rekombination

**[0088]** Die in den SEQ ID NRn: 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61 und 128 aufgeführten offenen Leserahmen, die für Polypeptide mit den Aminosäuresequenzen SEQ ID NRn: 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62 und 129 mit Desaturase-, Elongase-, KCR-, DH- und ECR-Aktivität kodieren, lassen sich in einer Polymerasekettenreaktion mit den in Tabelle 2 aufgeführten Primern amplifizieren. Hierbei wird der offene Leserahmen etwa 60 Nukleotide vom 3'-Ende der GAL1-Promotorsequenz 5'-fusioniert, mit gleichzeitiger Einführung einer Asc I- und/oder Nco I-Restriktionsstelle zwischen der Fusionsstelle, und etwa 60 Nukleotide vom 5'-Ende der CYC1-Terminatorsequenz 3'-fusioniert, mit gleichzeitiger Einführung einer Pac I-Restriktionsstelle. Zum Integrieren dieser Fragmente in pYES2.1 TOPO stromabwärts vom galactoseinduzierbaren GAL1-Promoter mittels homologer Rekombination kann man den Vektor pYES2.1 (Invitrogen) mit den Restriktionsendonukleasen Pvu II und Xba I verdauen, und *Saccharomyces cerevisiae* kann mit 5 bis 20 ng linearisiertem pYES2.1-TOPO-Vektor und 20 bis 100 ng PCR-Produkt pro 50 µl kompetenter Zellen unter Anwendung des von Schiestl et al. (Schiestl et al. (1989) Curr. Genet. 16(5-6), S. 339–346) beschriebenen Transformationsverfahrens transformieren, wodurch man pYes-pd5Des\_c738(No), pYes-pd6Des\_c2410(No), pYes-pd4Des\_c5834(No), pYes-pd8Des\_c20493(No), pYes-pd9Des\_c3000(No), pYes-pd12Des\_c6209(No), pYes-pd15Des\_c3421(No), pYes-pdxElo\_c1013(No), pYes-pdxElo\_c10303(No), pYes-pdxElo\_c2186(No), pYes-pdxElo\_c2529(No), pYes-pdxElo\_c37(No), pYes-pdxElo\_c38(No), pYes-pdxElo\_c4958(No), pYes-pdxElo\_c21679(No), pYes-pdxElo\_lrc26016(No), pYes-pKCR\_c20574(No), pYes-pKCR\_c20772(No), pYes-pKCR\_c2845(No), pYes-pDH\_c7190(No), pYes-pECR\_c41(No) und pYes-pd4Des(Mb) in verschiedenen Hefen vom Wildtyp erhält. Positive Transformanten können auf Grundlage der Komplementation der URA-Auxotrophie des ausgewählten *S. cerevisiae*-Stamms selektiert werden. Zur Validierung

der Korrektheit des von einem bestimmten Hefeklon beherbergten Expressionskonstrukts kann man Plasmide wie in Current Protocols in Molecular Biology (Hoffmann, Curr. Protoc. Mol. Biol. 2001 May; Kapitel 13: Unterkapitel 13.11) beschrieben isolieren, zur Amplifikation in *E. coli* transformieren und einer wie in Beispiel 2 beschriebenen Sequenzierung der Expressionskassette unterziehen.

Tabelle 2: Primersequenzen zur Klonierung der erfindungsgemäßen Polynukleotide von Desaturase, Keto-Acyl-CoA-Synthase, Keto-Acyl-CoA-Reduktase, Dehydratase und Enoyl-CoA-Reduktase zur Expression in Hefe

| Name              | Primer   | SEQ<br>-ID |
|-------------------|--|------------|
|                   | Vorwärts:  |            |
|                   | ataaaagtatcaacaaaaaattgtaatactatactttaacgtcaag   |            |
|                   | gagaaaaaaccccggatcggcgccaccatggcggcggcgaacga     |            |
| pd5Des_c738(No)   | cgccgc   | 64         |
|                   | Rückwärts:                                       |            |
|                   | aactataaaaaataaataggacctagacttcaggtgtctaactccttc |            |
|                   | ctttcggtagagcggatttaattaactagcccatgtgcacctccgccg | 65         |
|                   | Vorwärts:  |            |
|                   | ataaaagtatcaacaaaaaattgtaatactatactttaacgtcaag   |            |
|                   | gagaaaaaaccccggatcggcgccaccatgggacgcgggtggcga    |            |
| pd6Des_c2410(No)  | gcggat   | 66         |
|                   | Rückwärts:                                       |            |
|                   | aactataaaaaataaataggacctagacttcaggtgtctaactccttc |            |
|                   | ctttcggtagagcggatttaattaattacatggcggggaagtcggcca | 67         |
|                   | Vorwärts:  |            |
|                   | ataaaagtatcaacaaaaaattgtaatactatactttaacgtcaag   |            |
|                   | gagaaaaaaccccggatcggcgccaccatggccgatgtcgagtcc    |            |
| pd4Des_c5834(No)  | atcaa  | 68         |
|                   | Rückwärts:                                       |            |
|                   | aactataaaaaataaataggacctagacttcaggtgtctaactccttc |            |
|                   | ctttcggtagagcggatttaattaattacgaagaggaggtatgttg   | 69         |
|                   | Vorwärts:  |            |
|                   | ataaaagtatcaacaaaaaattgtaatactatactttaacgtcaag   |            |
|                   | gagaaaaaaccccggatcggcgccaccatggcggcggcggatgtg    |            |
| pd8Des_c20493(No) | gagac  | 70         |
|                   | Rückwärts:                                       | 71         |

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
|                   | aactataaaaaataaatagggacctagacttcaggtgtctaactcctc<br>ctttcgggttagagcggattaattaattacccccgccgccggtgtg    |    |
|                   | Vorwärts:   |    |
|                   | ataaaagtatcaacaaaaaattgtaataatacctctatactttaacgtcaag<br>gagaaaaaaccccgatcggcgccaccatggtctccagctcgccc  |    |
| pd9Des_c3000(No)  | gaga  | 72 |
|                   | Rückwärts:  |    |
|                   | aactataaaaaataaatagggacctagacttcaggtgtctaactcctc<br>ctttcgggttagagcggattaattaattaattgtactgggggtgattac | 73 |
|                   | Vorwärts:   |    |
|                   | ataaaagtatcaacaaaaaattgtaataatacctctatactttaacgtcaag<br>gagaaaaaaccccgatcggcgccaccatgggacgcggcggtga   |    |
| pd12Des_c6209(No) | gaagac  | 74 |
|                   | Rückwärts:  |    |
|                   | aactataaaaaataaatagggacctagacttcaggtgtctaactcctc<br>ctttcgggttagagcggattaattaactatgctcgctgttagaaca    | 75 |
|                   | Vorwärts:   |    |
|                   | ataaaagtatcaacaaaaaattgtaataatacctctatactttaacgtcaag<br>gagaaaaaaccccgatcggcgccaccatggttgagcaaacattgc |    |
| pd15Des_c3421(No) | cgac  | 76 |
|                   | Rückwärts:  |    |
|                   | aactataaaaaataaatagggacctagacttcaggtgtctaactcctc<br>ctttcgggttagagcggattaattaattacggaggggaggaagaacggg | 77 |
|                   | Vorwärts:   |    |
|                   | ataaaagtatcaacaaaaaattgtaataatacctctatactttaacgtcaag<br>gagaaaaaaccccgatcggcgccaccatgaagtgggtcctgcaa  |    |
| pdxElo_c1013(No)  | gaagg   | 78 |
|                   | Rückwärts:  |    |
|                   | aactataaaaaataaatagggacctagacttcaggtgtctaactcctc<br>ctttcgggttagagcggattaattaactactgtctttgtcttaccct   | 79 |
|                   | Vorwärts:   |    |
|                   | ataaaagtatcaacaaaaaattgtaataatacctctatactttaacgtcaag<br>gagaaaaaaccccgatcggcgccaccatgtctggttttgacccc  |    |
| pdxElo_c10303(No) | gc  | 80 |
|                   | Rückwärts:  |    |
|                   | aactataaaaaataaatagggacctagacttcaggtgtctaactcctc<br>ctttcgggttagagcggattaattaattacgccatctctttccattcc  | 81 |
|                   | Vorwärts:   |    |
|                   | ataaaagtatcaacaaaaaattgtaataatacctctatactttaacgtcaag<br>gagaaaaaaccccgatcggcgccaccatgctgagcaaaagcttc  |    |
| pdxElo_c2186(No)  | aatac   | 82 |
|                   | Rückwärts:  |    |
|                   | aactataaaaaataaatagggacctagacttcaggtgtctaactcctc  | 83 |

|                     |  |    |
|---------------------|--|----|
|                     | ctttcgggtagagcggatttaattaactactgtgctttctcaagtcca       |    |
|                     | Vorwärts:  |    |
|                     | ataaaagtatcaacaaaaaattgtaataacacctatactttaacgtcaag     |    |
| pdxElo_c2529(No)    | gagaaaaaaccccgatcggcgcgccaccatggaggccccctccc<br>cacct  | 84 |
|                     | Rückwärts:   |    |
|                     | aactataaaaaataaataggacctagactcagggtgtctaactccttc       |    |
|                     | ctttcgggtagagcggatttaattaacaccttctggggaggcaccg         | 85 |
|                     | Vorwärts:  |    |
|                     | ataaaagtatcaacaaaaaattgtaataacacctatactttaacgtcaag     |    |
| pdxElo_c37(No)      | gagaaaaaaccccgatcggcgcgccaccatggccgccccttcttc<br>aga   | 86 |
|                     | Rückwärts:   |    |
|                     | aactataaaaaataaataggacctagactcagggtgtctaactccttc       |    |
|                     | ctttcgggtagagcggatttaattaataatcttcttgagagccggct        | 87 |
|                     | Vorwärts:  |    |
|                     | ataaaagtatcaacaaaaaattgtaataacacctatactttaacgtcaag     |    |
| pdxElo_c38(No)      | gagaaaaaaccccgatcggcgcgccaccatgctgtcctcattcgact<br>cc  | 88 |
|                     | Rückwärts:   |    |
|                     | aactataaaaaataaataggacctagactcagggtgtctaactccttc       |    |
|                     | ctttcgggtagagcggatttaattaataatcgctctcttgggct           | 89 |
|                     | Vorwärts:  |    |
|                     | ataaaagtatcaacaaaaaattgtaataacacctatactttaacgtcaag     |    |
| pdxElo_c4958(No)    | gagaaaaaaccccgatcggcgcgccaccatggcagtgccctgtctg<br>aggt | 90 |
|                     | Rückwärts:   |    |
|                     | aactataaaaaataaataggacctagactcagggtgtctaactccttc       |    |
|                     | ctttcgggtagagcggatttaattaatcaaccctgctctccgccta         | 91 |
|                     | Vorwärts:  |    |
|                     | ataaaagtatcaacaaaaaattgtaataacacctatactttaacgtcaag     |    |
| pdxElo_c21679(No)   | gagaaaaaaccccgatcggcgcgccaccatgcttcagttatttccccg<br>c  | 92 |
|                     | Rückwärts:   |    |
|                     | aactataaaaaataaataggacctagactcagggtgtctaactccttc       |    |
|                     | ctttcgggtagagcggatttaataacacgtgcaagctaccatacgg         | 93 |
|                     | Vorwärts:  |    |
|                     | ataaaagtatcaacaaaaaattgtaataacacctatactttaacgtcaag     |    |
| pdxElo_irc26016(No) | gagaaaaaaccccgatcggcgcgccaccatgccaagctccagag<br>atctc  | 94 |
|                     | Rückwärts:   |    |
|                     | aactataaaaaataaataggacctagactcagggtgtctaactccttc       |    |
|                     | ctttcgggtagagcggatttaattaatcatcgcttgatttcttg           | 95 |



|                 |  |     |
|-----------------|--|-----|
|                 | Vorwärts:  |     |
|                 | ataaaagtatcaacaaaaaattgtaataatacctctatactttaacgtcaag     |     |
| pKCR_c20574(No) | gagaaaaacccccggatcggcgcgccaccatgggtctcgacgtgaag<br>gagaa | 96  |
|                 | Rückwärts:   |     |
|                 | aactataaaaaataaataggacctagacttcaggtgtctaactccttc         |     |
|                 | ctttcgggttagagcggatttaattaactacgcagcggccttgatctct        | 97  |
|                 | Vorwärts:  |     |
|                 | ataaaagtatcaacaaaaaattgtaataatacctctatactttaacgtcaag     |     |
| pKCR_c20772(No) | gagaaaaacccccggatcggcgcgccaccatggcatctaaaggtggc<br>aattt | 98  |
|                 | Rückwärts:   |     |
|                 | aactataaaaaataaataggacctagacttcaggtgtctaactccttc         |     |
|                 | ctttcgggttagagcggatttaattaatcaagcgtcttctcattctct         | 99  |
|                 | Vorwärts:  |     |
|                 | ataaaagtatcaacaaaaaattgtaataatacctctatactttaacgtcaag     |     |
| pKCR_c2845(No)  | gagaaaaacccccggatcggcgcgccaccatggcgttgacgtgaag<br>gagaa  | 100 |
|                 | Rückwärts:   |     |
|                 | aactataaaaaataaataggacctagacttcaggtgtctaactccttc         |     |
|                 | ctttcgggttagagcggatttaattaacttactcccccttccctt            | 101 |
|                 | Vorwärts:  |     |
|                 | ataaaagtatcaacaaaaaattgtaataatacctctatactttaacgtcaag     |     |
| pDH_c7190(No)   | gagaaaaacccccggatcggcgcgccaccatgggaggtggcagtaaa<br>agcgg | 102 |
|                 | Rückwärts:   |     |
|                 | aactataaaaaataaataggacctagacttcaggtgtctaactccttc         |     |
|                 | ctttcgggttagagcggatttaattaactatcggcctccggctcttcc         | 103 |
|                 | Vorwärts:  |     |
|                 | ataaaagtatcaacaaaaaattgtaataatacctctatactttaacgtcaag     |     |
| pECR_c41(No)    | gagaaaaacccccggatcggcgcgccaccatgggcaagcctcagcg<br>agcaa  | 104 |
|                 | Rückwärts:   |     |
|                 | aactataaaaaataaataggacctagacttcaggtgtctaactccttc         |     |
|                 | ctttcgggttagagcggatttaattaactaaaaccagcgtatccctga         | 105 |
|                 | Vorwärts:  |     |
|                 | ataaaagtatcaacaaaaaattgtaataatacctctatactttaacgtcaag     |     |
| pd4Des(Mb)      | gagaaaaacccccggatcggcgcgccaccatggctagttcagttgaga<br>ggga | 130 |
|                 | Rückwärts:   |     |
|                 | aactataaaaaataaataggacctagacttcaggtgtctaactccttc         |     |
|                 | ctttcgggttagagcggatttaattaatgaagcagctctaggcttaactt       | 131 |

**[0089]** Eine Liste identifizierter vollständiger Codierungssequenzen ist in Tabelle 3 angeführt.

Tabelle 3: Codierende Polynukleotidsequenzen, von diesen codierte Aminosäuresequenzen und exprimierte Sequenzen (mRNA) von erfindungsgemäßen Desaturasen, Elongasen bzw. Elongase-Komponenten aus *Nannochloropsis oculata*.

| Name des Gens       | Aktivität      | OLR in bp | SEQ-ID Nr. | Aminosäuren | SEQ-ID Nr. | mRNA in bp | SEQ-ID Nr. |
|---------------------|----------------|-----------|------------|-------------|------------|------------|------------|
| pd5Des_c738(No)     | d5-Desaturase  | 1581      | 1          | 526         | 2          | 1972       | 3          |
| pd6Des_c2410(No)    | d6-Desaturase  | 1425      | 4          | 474         | 5          | 1565       | 6          |
| pd4Des_c5834(No)    | d4-Desaturase  | 1527      | 7          | 508         | 8          | 1963       | 9          |
| pd8Des_c20493(No)   | d8-Desaturase  | 1449      | 10         | 482         | 11         | 1954       | 12         |
| pd9Des_c3000(No)    | d9-Desaturase  | 1080      | 13         | 359         | 14         | 1534       | 15         |
| pd12Des_c6209(No)   | d12-Desaturase | 1317      | 16         | 438         | 17         | 2049       | 18         |
| pd15Des_c3421(No)   | d15-Desaturase | 1242      | 19         | 413         | 20         | 2079       | 21         |
| pdxElo_c1013(No)    | KCS            | 906       | 22         | 301         | 23         | 1086       | 24         |
| pdxElo_c10303(No)   | KCS            | 1023      | 25         | 340         | 26         | 1894       | 27         |
| pdxElo_c2186(No)    | KCS            | 1095      | 28         | 364         | 29         | 1685       | 30         |
| pdxElo_c2529(No)    | KCS            | 951       | 31         | 316         | 32         | 1060       | 33         |
| pdxElo_c37(No)      | KCS            | 831       | 34         | 276         | 35         | 1302       | 36         |
| pdxElo_c38(No)      | KCS            | 897       | 37         | 298         | 38         | 2441       | 39         |
| pdxElo_c4958(No)    | KCS            | 903       | 40         | 300         | 41         | 1053       | 42         |
| pdxElo_c21679(No)   | KCS            | 1485      | 43         | 495         | 44         | 1755       | 45         |
| pdxElo_lrc26016(No) | KCS            | 966       | 46         | 321         | 47         | 1689       | 48         |
| pKCR_c20574(No)     | KCR            | 1071      | 49         | 356         | 50         | 1304       | 51         |
| pKCR_c20772(No)     | KCR            | 978       | 52         | 325         | 53         | 1115       | 54         |
| pKCR_c2845(No)      | KCR            | 1044      | 55         | 347         | 56         | 1751       | 57         |
| pDH_c7190(No)       | DH             | 768       | 58         | 202         | 59         | 1293       | 60         |
| pECR_c41(No)        | ECR            | 1620      | 61         | 539         | 62         | 2229       | 63         |
| pd4Des(Mb)          | d4-Desaturase  | 1320      | 128        | 439         | 129        | 1515       | 130        |

#### Beispiel 4: Aktivitätsassay in Hefe

**[0090]** Als Beispiel wurde die Aktivität identifizierter Polypeptide durch heterologe Expression in Hefe bestätigt. In Tabelle 4 ist der Aktivitätsassay von mit dem leeren pYes-Vektor, pYes-pd4Des(Mb)-, pYes-pd5Des\_c738(No)- und pYes-pdoDes\_c2410(No)-Konstrukt transformierten Kontrollhefen gezeigt. In den Gaschromatogrammen von mit pYes-pd4Des(Mb) transformierten und mit 22:4n-6 oder 22:5n-3 gefütterten Hefeextrakten wurden die d4-entsättigten Fettsäuren 22:5n-6 und 22:6n-3 nachgewiesen (**Fig. 1**, Tabelle 4). Dieses Ergebnis zeigt, dass pYes-pd4Des(Mb) d4-Desaturase-Aktivität aufweist. In den Gaschromatogrammen von mit pYes-pd5Des\_c738(No) transformierten und mit 20:3n-6 oder 20:4n-3 gefütterten Hefeextrakten wurden die d5-entsättigten Fettsäuren 20:4n-6 und 20:5n-3 nachgewiesen (**Fig. 1**, Tabelle 4). Die Fettsäuren 20:4n-6 und 20:5n-3 waren in mit dem Kontrollvektor transformierter und mit 20:3n-6 und 20:4n-3 transformierter Hefe nicht vorhanden. Diese Analyse zeigt, dass pYes-pd5Des\_c738(No) d5-Desaturase-Aktivität aufweist.

**[0091]** Nur in den mit pYes-pdoDes\_c2410(No) transformierten und mit 18:2n-6 oder 18:3n-3 gefütterten Hefeextrakten wurden die d6-entsättigten Fettsäuren 18:3n-6 und 18:4n-3 nachgewiesen (Fig. 1, Tabelle 4). Dieses Ergebnis zeigt unzweideutig, dass pdoDes\_c2410 (No) d6-Desaturase-Aktivität aufweist. Darüber hinaus legt das nachgewiesene 18:4n-3-Produkt nahe, dass pYes-pdoDes\_c2410 (No) auch d15-Desaturase-Aktivität aufweist.

Tabelle 4: Hefefütterungsexperiment. Die Substrat- und Produktfettsäuren sind in Prozent des gesamten Fettsäurepools angegeben. Die Chromatogramme der Messungen sind in Fig. 1 gezeigt.

| Vektor           | Substrat |       | Produkt |      | Umwandlung (%) | Aktivität | Figur |
|------------------|----------|-------|---------|------|----------------|-----------|-------|
|                  |          |       |         |      |                |           |       |
| pYes             | 22:4n-6  | 73,28 | 22:5n-6 | 0,00 | 0,00           | -         | 1A    |
| pYes             | 22:5n-3  | 72,01 | 22:6n-3 | 0,00 | 0,00           | -         | 1B    |
| pYes-pd4Des(Mb)  | 22:4n-6  | 66,77 | 22:5n-6 | 7,35 | 9,91           | d4Des     | 1C    |
| pYes-pd4Des(Mb)  | 22:5n-3  | 64,10 | 22:6n-3 | 7,74 | 10,78          | d4Des     | 1D    |
| pYes             | 20:3n-6  | 89,93 | 20:4n-6 | 0,00 | 0,00           | -         | 1E    |
| pYes             | 20:4n-3  | 60,64 | 20:5n-3 | 0,00 | 0,00           | -         | 1F    |
| pd5Des_c738(No)  | 20:3n-6  | 85,00 | 20:4n-6 | 4,12 | 4,62           | d5Des     | 1G    |
| pd5Des_c738(No)  | 20:4n-3  | 58,89 | 20:5n-3 | 6,75 | 10,29          | d5Des     | 1H    |
| pYes             | 18:2n-6  | 20,9  | 18:3n-6 | 0,0  | 0,00           | -         | 1I    |
| pYes             | 18:3n-3  | 13,2  | 18:4n-3 | 0,0  | 0,00           | -         | 1J    |
| pYes             |          |       |         |      |                |           |       |
| pd6Des_c2410(No) | 18:2n-6  | 20,2  | 18:3n-6 | 10,6 | 34,46          | d6Des     | 1K    |
| pYes             |          |       |         |      |                |           |       |
| pd6Des_c2410(No) | 18:2n-6  | 20,2  | 18:4n-3 | 2,0  | 9,00           | d15Des    | 1K    |
| pYes             |          |       |         |      |                |           |       |
| pd6Des_c2410(No) | 18:3n-3  | 5,3   | 18:4n-3 | 6,9  | 56,44          | d6Des     | 11    |

**[0092]** Darüber hinaus wurde die Aktivität der identifizierten Elo-Komponente-Polypeptide analysiert.

**[0093]** Die Fettsäuren 18:3n-6 und 18:4n-3 wurden an die pdxElo\_c37(No) und pdxElo\_c1013(No) exprimierenden Hefen verfüttert. Als Kontrolle wurden mit dem leeren pYes-Vektor transformierte Hefen in das Experiment aufgenommen. Im Gegensatz zu den Kontroll-Hefen produzierten mit pYes-pdxElo\_c37(No) bzw. pYes-pdxElo\_c1013(No) transformierte Hefen 20:3n-6 bzw. 20:4-3; dies zeigt, dass pdxElo\_c37(No) und pdxElo\_c1013(No) d6-Elongase-Aktivität aufweisen.

Tabelle 5: Hefefütterungsexperiment. Substrat- und Produktfettsäure sind in Prozent des gesamten Fettsäurepools angegeben.

| Vektor                | Substrat |       | Produkt |      | Umwandlung |           |
|-----------------------|----------|-------|---------|------|------------|-----------|
|                       |          |       |         |      | (%)        | Aktivität |
| pYes                  | 18:3n-6  | 63,87 | 20:3n-6 | 0,00 | 0,00       | -         |
| pYes                  | 18:4n-3  | 71,28 | 20:4n-3 | 0,00 | 0,00       | -         |
| pYespdxElo_c37(No)    | 18:3n-6  | 72,97 | 20:3n-6 | 3,35 | 4,39       | doElo     |
| pYes-pdxElo_c37(No)   | 18:4n-3  | 69,09 | 20:4n-3 | 0,77 | 1,11       | doElo     |
| pYes-pdxElo_c1013(No) | 18:3n-6  | 70,39 | 20:3n-6 | 1,49 | 2,07       | doElo     |

| Vektor            | Substrat |       | Produkt |      | Umwandlung |           |
|-------------------|----------|-------|---------|------|------------|-----------|
|                   |          |       |         |      | (%)        | Aktivität |
| pYes              | 18:2n-6  | 42,74 | 20:2n-6 | 0,00 | 0,00       | -         |
| pd9Elo_c21679(No) | 18:2n-6  | 47,81 | 20:2n-6 | 0,54 | 1,12       | d9Elo     |

Beispiel 5: Expression von Desaturase, KCS, KCR, DH und ECR in Pflanzen.

**[0094]** Die neuen Desaturasen, KCS, KCR, DH und ECR aus *Nannochloropsis oculata* lassen sich wie in WO2003/093482, WO2005/083093 oder WO2007/093776 beschrieben in einem Pflanzentransformationsvektor klonieren.

**[0095]** Beispielhafte geeignete Genkombinationen für die Produktion von ARA, EPA und DHA sind in den Tabellen 6, 7, 8 und 9 beschrieben.

Tabelle 6: Genkombinationen für die Produktion von Arachidonsäure. Für Arachidonsäure ist mindestens ein Enzym mit einer d12-Desaturase-, d6-Desaturase-, d6-Elongase- und d5-Desaturase-Aktivität erforderlich. Verschiedene Biosyntheseschritte lassen sich durch Enzyme von *Nannochloropsis oculata* gemäß der vorliegenden Erfindung katalysieren.

| Aktivität      | Gen               | Ursprungsorganismus      | SEQ ID NR: |
|----------------|-------------------|--------------------------|------------|
| d12-Desaturase | d12Des(Ps)        | Phytophthora soja        | 106        |
|                | pd12Des_c6209(No) | Nannochloropsis oculata  | 16         |
| d6-Desaturase  | d6Des(Ot)         | Ostreococcus tauri       | 108        |
|                | pd6Des(No)        | Nannochloropsis oculata  | 4          |
| d6-Elongase    | d6Elo(Tp)         | Thalassiosira pseudonana | 110        |
|                | d6Elo(Pp)         | Physcomitrella patens    | 112        |
|                | pdxElo_c1013(No)  | Nannochloropsis oculata  | 22         |
|                | pdxElo_c10303(No) | Nannochloropsis oculata  | 25         |
|                | pdxElo_c2186(No)  | Nannochloropsis oculata  | 28         |
|                | pdxElo_c2529(No)  | Nannochloropsis oculata  | 31         |
|                | pdxElo_c37(No)    | Nannochloropsis oculata  | 34         |
|                | pdxElo_c38(No)    | Nannochloropsis oculata  | 37         |
|                | pdxElo_c4958(No)  | Nannochloropsis oculata  | 40         |
|                | pdxElo_c21679(No) | Nannochloropsis oculata  | 43         |
| d5-Desaturase  | d5Des(Tc)         | Thraustochytrium sp.     | 114        |
|                | pd5Des_c738(No)   | Nannochloropsis oculata  | 1          |
| KCR            | pKCR_c20574(No)   | Nannochloropsis oculata  | 49         |
|                | pKCR_c20772(No)   | Nannochloropsis oculata  | 52         |
|                | pKCR_c2845(No)    | Nannochloropsis oculata  | 55         |
| DH             | pDH_c7190(No)     | Nannochloropsis oculata  | 58         |
| ECR            | pECR_c41(No)      | Nannochloropsis oculata  | 61         |

**[0096]** Arachidonsäure lässt sich über einen alternativen Pfad, an dem d9-Elongase- und d8-Desaturaseaktivität beteiligt sind, produzieren. Tabelle 7 zeigt eine Genkombination für diesen Pfad.

Tabelle 7: Genkombinationen für den alternativen Pfad für die Herstellung von Arachidonsäure. Mehrere Biosyntheseschritte lassen sich durch Enzyme von *Nannochloropsis oculata* gemäß der vorliegenden Erfindung katalysieren.

| Aktivität      | Gen                 | Ursprungsorganismus     | SEQ ID NR: |
|----------------|---------------------|-------------------------|------------|
| d12-Desaturase | d12Des(Ps)          | Phytophthora soja       | 106        |
|                | pd12Des_c6209(No)   | Nannochloropsis oculata | 16         |
| d9-Elongase    | d9Elo(Ig)           | Isochrysis galbana      | 116        |
|                | pdxElo_c21679(No)   | Nannochloropsis oculata | 43         |
| d8-Desaturase  | d8Des(Pm)           | Perkinsus marinus       | 113        |
|                | pd8Des_c20493(No)   | Nannochloropsis oculata | 10         |
| d6-Elongase    | pdxElo_c1013(No)    | Nannochloropsis oculata | 22         |
|                | pdxElo_c10303(No)   | Nannochloropsis oculata | 25         |
|                | pdxElo_c2186(No)    | Nannochloropsis oculata | 28         |
|                | pdxElo_c2529(No)    | Nannochloropsis oculata | 31         |
|                | pdxElo_c37(No)      | Nannochloropsis oculata | 34         |
|                | pdxElo_c38(No)      | Nannochloropsis oculata | 37         |
|                | pdxElo_c4958(No)    | Nannochloropsis oculata | 40         |
|                | pdxElo_c21679(No)   | Nannochloropsis oculata | 43         |
|                | pdxElo_Irc26016(No) | Nannochloropsis oculata | 46         |
| d5-Desaturase  | d5Des(Tc)           | Thraustochytrium sp.    | 114        |
|                | pd5Des_c738(No)     | Nannochloropsis oculata | 1          |
| KCR            | pKCR_c20574(No)     | Nannochloropsis oculata | 49         |
|                | pKCR_c20772(No)     | Nannochloropsis oculata | 52         |
|                | pKCR_c2845(No)      | Nannochloropsis oculata | 55         |
| DH             | pDH_c7190(No)       | Nannochloropsis oculata | 58         |
| ECR            | pECR_c41(No)        | Nannochloropsis oculata | 61         |

**[0097]** Für die Herstellung von EPA werden die in Tabelle 8 aufgeführten Gene mit den in Tabelle 6 oder 7 aufgeführten Genen kombiniert.

Tabelle 8: Zur Herstellung von EPA ist zusätzlich zu Kombinationen von in Tabelle 6 oder 7 aufgeführten Genen die Expression von Genen dieser Tabelle erforderlich.

| Aktivität          | Gen               | Ursprungsorganismus     | SEQ ID NR: |
|--------------------|-------------------|-------------------------|------------|
| d15-Desaturase     | d15Des(Hr)        | Helobdella robusta      | 120        |
|                    | pd15Des_c3421(No) | Nannochloropsis oculata | 19         |
| Omega-3-Desaturase | o3Des(Pi)         | Phytophthora infestans  | 122        |

**[0098]** Zusätzlich zu den Genen von Tabelle 5, 6, 7 sind für die Biosynthese von DHA die in Tabelle 8 aufgeführten Gene erforderlich. Diese Gene ermöglichen die Verlängerung von EPA um 2 Kohlenstoffatome und die Dehydrierung am 4. und 5. Kohlenstoffatom, was zur Bildung von DHA führt.

Tabelle 9: Zur Herstellung von DHA werden zusätzlich zu den Genen von Tabelle 6 oder 7 und 8 die Gene dieser Tabelle benötigt.

| Aktivität     | Gen              | Ursprungsorganismus     | SEQ ID NR: |
|---------------|------------------|-------------------------|------------|
| d5-Elongase   | d5Elo(Ot)        | Ostreococcus tauri      | 124        |
| d4-Desaturase | d4Des(Tc)        | Thraustochytrium sp.    | 126        |
|               | pd4Des_c5834(No) | Nannochloropsis oculata | 7          |
|               | pd4Des(Mb)       | Monosiga brevicollis    | 128        |

**[0099]** Transgene Rapslinien werden wie in Deblaere et al. (1984), (Nucl. Acids. Res. 13, 4777–4788) beschrieben erzeugt, und die Samen von transgenen Rapspflanzen werden wie in Qiu et al. (2001)(J. Biol. Chem. 276, 31561–31566) beschrieben analysiert.

#### Referenzliste

- Aronel, V., Lemieux, B., Hwang, I., Gibson, S., Goodman, H. M., und Somerville, C. R. (1992). Map-based cloning of a gene controlling omega-3 fatty acid desaturation in Arabidopsis. *Science* 258, 1353–1355.
- Broadwater, J. A., Whittle, E., und Shanklin, J. (2002). Desaturation and hydroxylation. Residues 148 and 324 of Arabidopsis FAD2, in addition to substrate chain length, exert a major influence in partitioning of catalytic specificity. *J. Biol. Chem.* 277, 15613–15620.
- Broun, P., Shanklin, J., Whittle, E., und Somerville, C. (1998b). Catalytic plasticity of fatty acid modification enzymes underlying chemical diversity of plant lipids. *Science* 282, 1315–1317.
- Calvo, A. M., Gardner, H. W., und Keller, N. P. (2001). Genetic connection between fatty acid metabolism and sporulation in *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* 276, 25766–25774.
- Knutzon, D. S., Thurmond, J. M., Huang, Y. S., Chaudhary, S., Bobik, E. G., Jr., Chan, G. M., Kirchner, S. J., und Mukerji, P. (1998). Identification of Delta5-dehydratase from *Mortierella alpina* by heterologous expression in Baker's yeast and canola. *J. Biol. Chem.* 273, 29360–29366.
- Mantle, P. G. und Nisbet, L. J. (1976). Differentiation of *Claviceps purpurea* in axenic culture. *J. Gen. Microbiol.* 93, 321–334.
- Mey, G., Oeser, B., Lebrun, M. H., und Tudzynski, P. (2002). The biotrophic, non-appressoriumforming grass pathogen *Claviceps purpurea* needs a Fus3/Pmk1 homologous mitogen-activated protein kinase for colonization of rye ovarian tissue. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15, 303–312.
- Okuley, J., Lightner, J., Feldmann, K., Yadav, N., Lark, E., und Browse, J. (1994). Arabidopsis FAD2 gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis. *Plant Cell* 6, 147–158.
- Qi, B., Fraser, T., Mugford, S., Dobson, G., Sayanova, O., Butler, J., Napier, J. A., Stobart, A. K., und Lazarus, C. M. (2004). Production of very long chain polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids in plants. *Nat. Biotechnol.* 22, 739–745.
- Shanklin, J., und Cahoon, E. B. (1998). DESATURATION AND RELATED MODIFICATIONS OF FATTY ACIDS 1, *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 49, 611–641.
- Tudzynski, P., Correia, T., und Keller, U. (2001). Biotechnology and genetics of ergot alkaloids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 593–605.

**Es folgt ein Sequenzprotokoll nach WIPO St. 25. Dieses kann von der amtlichen Veröffentlichungsplattform des DPMA heruntergeladen werden.**

**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**

- EP 0388186 A1 [0039]
- EP 0335528 A1 [0039]
- WO 93/21334 [0039]
- EP 0249676 A1 [0039]
- US 5608152 [0039, 0047]
- WO 98/45461 [0039, 0047]
- US 5504200 [0039, 0047]
- WO 91/13980 [0039, 0047]
- WO 95/15389 [0039, 0047]
- WO 95/23230 [0039, 0047]
- WO 99/16890 [0039, 0039, 0047]
- US 5352605 [0047]
- WO 84/02913 [0047]
- US 4962028 [0047]
- WO 95/19443 [0047]
- US 5187267 [0047]
- WO 96/12814 [0047]
- EP 0375091 A [0047]
- WO 95/16783 [0047]
- WO 97/06250 [0047]
- WO 99/46394 [0047]
- US 2003-0159174 [0049]
- WO 2007042510 [0055]
- WO 2008006202 [0055]
- WO 2009016202 [0055, 0055, 0055, 0055, 0055, 0055, 0055, 0055, 0055]
- WO 200185968 [0055]
- WO 2008040787 [0055, 0055, 0055, 0055, 0055]
- WO 2006100241 [0055, 0055, 0055, 0055, 0055]
- WO 2006069710 [0055, 0055, 0055, 0055, 0055]
- WO 2004090123 [0055]
- WO 2002026946 [0055, 0055, 0055, 0055]
- WO 2004057001 [0055]
- WO 2002057465 [0055, 0055]
- WO 2000075341 [0055]
- WO 2003072784 [0055, 0055, 0055]
- WO 200102591 [0055]
- EP 1790731 [0055]
- WO 200034439 [0055]
- WO 2007093776 [0055, 0055]
- WO 2005083053 [0055]
- WO 2008022963 [0055, 0055]
- WO 2005012316 [0055, 0055, 0055, 0055, 0055, 0055, 0055, 0055, 0055, 0055]
- WO 2003064638 [0055]
- WO 2009016208 [0055, 0055]
- WO 2001059128 [0055]
- WO 2002077213 [0055]
- WO 2003/093482 [0094]
- WO 2005/083093 [0094]
- WO 2007/093776 [0094]

**Zitierte Nicht-Patentliteratur**

- Crawford, M. A., et al., (1997) Am. J. Clin. Nutr. 66:1032S-1041S [0004]
- Giusto, N. M., et al. (2000) Prog. Lipid Res. 39:315-391 [0004]
- Martinecz, M. (1992) J. Pediatr. 120:S129-S138 [0004]
- Giusto, N. M., et al. (2000) Prog. Lipid Res. 39:315-391 [0004]
- Horrocks, L. A. und Yeo, Y. K. (1999) Pharmacol. Res. 40:211-215 [0004]
- Spector, A. A. (1999) Lipids 34:S1-S3 [0004]
- Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 [0030]
- Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989 [0030]
- Hames und Higgins (Hrsg.) 1985, "Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford [0030]
- Brown (Hrsg.) 1991, "Essential Molecular Biology: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford [0030]
- Needleman 1970, J. Mol. Biol. (48):444-453 [0030]
- EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice, P., Longden, I., und Bleasby, A., Trends in Genetics 16(6), 276-277, 2000 [0030]
- <http://emboss.sourceforge.net> [0030]
- EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice, P., Longden, I. und Bleasby, A, Trends in Genetics 16(6), 276-277, 2000 [0030]
- Altschul 1990, J. Mol. Biol. 215:403-10 [0030]
- Altschul 1997, Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402 [0030]
- Franck 1980, Cell 21: 285-294 [0039]
- Ward 1993, Plant. Mol. Biol. 22 [0039]
- Baumlein et al., Plant J., 2, 2, 1992:233-239 [0039]

- Loke 2005, *Plant Physiol* 138, S. 1457–1468 [0042]
- Sambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) [0044]
- *Molecular Biology*, 1995, Bd. 44, *Agrobacterium* protocols, Hrsg.: Gartland und Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey [0044]
- Hellens et al., *Trends in Plant Science* (2000) 5, 446–451 [0045]
- *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* [0045]
- *Transgenic Plants*, Bd. 1, *Engineering and Utilization*, Hrsg.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, 15–38 [0045]
- 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 [0045]
- Potrykus 1991, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42, 205–225 [0045]
- Pharmacia Biotech Inc; Smith 1988, *Gene* 67: 31–40 [0046]
- Amann 1988, *Gene* 69:301–315 [0046]
- Studier 1990, *Methods in Enzymology* 185, 60–89 [0046]
- Baldari 1987, *Embo J.* 6:229–234 [0046]
- Kurjan 1982, *Cell* 30:933–943 [0046]
- Schultz 1987, *Gene* 54:113–123 [0046]
- *Applied Molecular Genetics of fungi*, J. F. Peberdy et al., Hrsg., S. 1–28, Cambridge University Press: Cambridge [0046]
- *More Gene Manipulations in Fungi* (J. W. Bennett & L. L. Lasure, Hrsg., S. 396–428: Academic Press: San Diego) [0046]
- Smith 1983, *Mol. Cell Biol.* 3:2156–2165 [0046]
- Lucklow 1989, *Virology* 170:31–39 [0046]
- Falciatore 1999, *Marine Biotechnology* 1 (3): 239–251 [0047]
- Becker 1992, *Plant Mol. Biol.* 20:1195–1197; Bevan 1984, *Nucl. Acids Res.* 12:8711–8721; *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants* [0047]
- *Transgenic Plants*, Bd. 1, *Engineering and Utilization*, Hrsg.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15–38 [0047]
- Gielen 1984, *EMBO J.* 3, 835 [0047]
- Gallie 1987, *Nucl. Acids Research* 15:8693–8711 [0047]
- Benfey 1989, *EMBO J.* 8:2195–2202 [0047]
- Franck 1980, *Cell* 21:285–294 [0047]
- Kermode 1996, *Crit. Rev. Plant Sci.* 15, 4: 285–423 [0047]
- Gatz 1997, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48:89–108 [0047]
- Gatz 1992, *Plant J.* 2, 397–404 [0047]
- Ward 1993, *Plant Mol. Biol.* 22:361–366 [0047]
- Baeumlein 1991, *Mol. Gen. Genet.* 225 (3): 459–67 [0047]
- LeB4; Baeumlein 1992, *Plant Journal*, 2 (2): 233–9 [0047]
- *Cloning Vectors* (Hrsg.: Pouwels, P. H., et al., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018) [0048]
- Mann 2003, *Nat. Biotechnol.* 21, 255–261 [0060]
- *Fokus auf Pflanzen in Huber* 2004, *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 318–322 [0060]
- <http://www.abrf.org/index.cfm/dm.home> [0060]
- *Lehrbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology* (Washington D. C., USA, 1981) [0074]
- Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87965-309-6) [0086]
- Sanger et al. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463–5467 [0087]
- Schiestl et al. (1989) *Curr. Genet.* 16(5-6), S. 339–346 [0088]
- *Molecular Biology* (Hoffmann, *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2001 May; Kapitel 13:Unterkapitel 13.11) [0088]
- Deblaere et al. (1984), (*Nucl. Acids. Res.* 13, 4777–4788) [0099]
- Qiu et al. (2001)(*J. Biol. Chem.* 276, 31561–31566) [0099]



## Patentansprüche

1. Polynukleotid, das eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die gewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:
  - a) einer Nukleinsäuresequenz mit einer Nukleotidsequenz, wie in SEQ ID NRn: 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 46, 49, 52, 55, 58, 61 oder 128 gezeigt;
  - b) einer Nukleinsäuresequenz, codierend ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID NRn: 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62 oder 129 gezeigt;
  - c) einer Nukleinsäuresequenz, die mindestens 70% identisch zur Nukleinsäuresequenz von a) oder b) ist, wobei die Nukleinsäuresequenz ein Polypeptid mit Desaturase-, KCS-, KCR-, DH-, oder ECR-Aktivität codiert;
  - d) einer Nukleinsäuresequenz, codierend ein Polypeptid mit Desaturase-, KCS-, KCR-, DH-, oder ECR-Aktivität und mit einer Aminosäuresequenz, die mindestens 70% identisch zur Aminosäuresequenz von einem Beliebigen von a) bis c) ist; und
  - e) einer Nukleinsäuresequenz, die unter stringenten Bedingungen zum Hybridisieren an ein Beliebiges von a) bis d) in der Lage ist, wobei die Nukleinsäuresequenz ein Polypeptid mit Desaturase-, KCS-, KCR-, DH-, oder ECR-Aktivität codiert.
2. Polynukleotid von Anspruch 1, wobei das Polynukleotid ferner eine Expressions-Steuerungssequenz umfasst, die operativ an die Nukleinsäuresequenz verknüpft ist.
3. Polynukleotid von Anspruch 1 oder 2, wobei das Polynukleotid ferner eine Terminatorsequenz umfasst, die operativ an die Nukleinsäuresequenz verknüpft ist.
4. Vektor, welcher das Polynukleotid von einem beliebigen der Ansprüche 1 bis 3 umfasst.
5. Wirtszelle, die das Polynukleotid von einem beliebigen der Ansprüche 1 bis 3 oder den Vektor von Anspruch 4 umfasst.
6. Verfahren zur Herstellung eines, durch ein Polynukleotid von einem beliebigen der Ansprüche 1 bis 3 codierten Polypeptids, das Folgendes umfasst:
  - a) Kultivieren der Wirtszelle von Anspruch 5 unter Bedingungen, welche die Herstellung des Polypeptids gestatten; und
  - b) Gewinnen des Polypeptids aus der Wirtszelle von Schritt a).
7. Polypeptid, welches durch das Polynukleotid von einem beliebigen der Ansprüche 1 bis 3 codiert wird oder welches durch das Verfahren von Anspruch 6 erhältlich ist.
8. Nicht-menschlicher transgener Organismus, der das Polynukleotid von einem beliebigen der Ansprüche 1 bis 3 oder den Vektor von Anspruch 4 umfasst.
9. Nicht-menschlicher transgener Organismus von Anspruch 8, bei dem es sich um eine Pflanze, einen Pflanzenteil oder Pflanzensamen handelt.
10. Verfahren zur Herstellung von mehrfach-ungesättigten Fettsäuren, das Folgendes umfasst:
  - a) Kultivieren der Wirtszelle von Anspruch 5 unter Bedingungen, welche die Herstellung von mehrfach-ungesättigten Fettsäuren in der Wirtszelle gestatten; und
  - b) Gewinnen der mehrfach-ungesättigten Fettsäuren aus der Wirtszelle.
11. Verfahren zur Herstellung von mehrfach-ungesättigten Fettsäuren, das Folgendes umfasst:
  - a) Kultivieren des nicht-menschlichen transgenen Organismus von Anspruch 8 oder 9 unter Bedingungen, welche die Herstellung von mehrfach-ungesättigten Fettsäuren in der Wirtszelle gestatten; und
  - b) Gewinnen der mehrfach-ungesättigten Fettsäuren aus dem nicht-menschlichen transgenen Organismus.
12. Verfahren von Anspruch 10 oder 11, wobei die mehrfach-ungesättigte Fettsäure Arachidonsäure (ARA), Eicosapentaensäure (EPA) oder Docosahexaensäure (DHA) ist.
13. Verfahren zur Herstellung einer Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung, welches die Schritte des Verfahrens von einem beliebigen der Ansprüche 10 bis 12 und den weiteren Schritt des Formulierens der mehrfach-ungesättigten Fettsäure als Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung umfasst.

14. Verfahren von Anspruch 13, wobei die Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung für Futter, Nahrungsmittel, Kosmetika oder Medikamente verwendet werden soll.

15. Öl, umfassend eine mehrfach-ungesättigte Fettsäure, die durch das Verfahren von einem beliebigen der Ansprüche 10 bis 12 erhältlich ist.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

Fig.

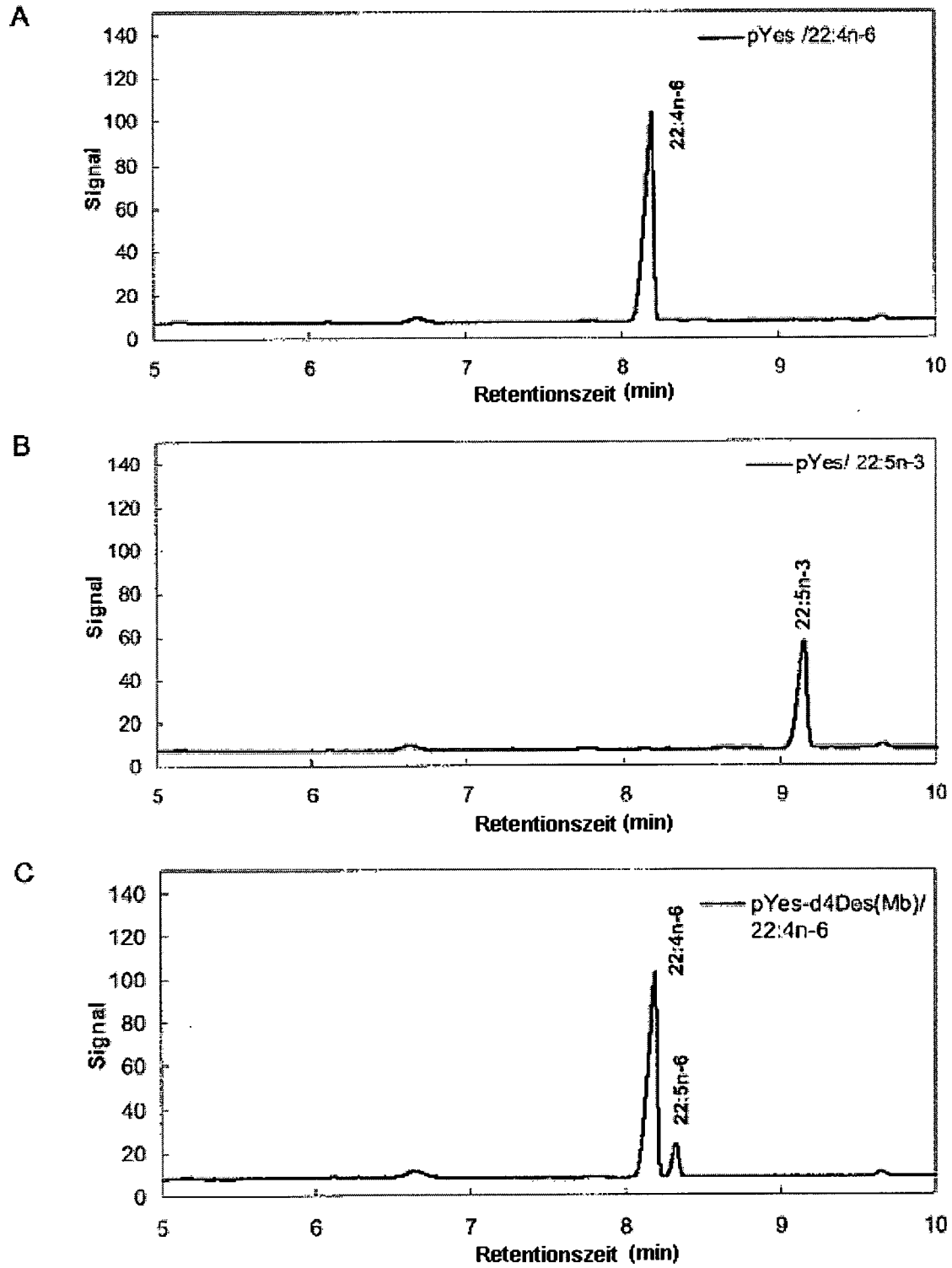


Fig. Forts.

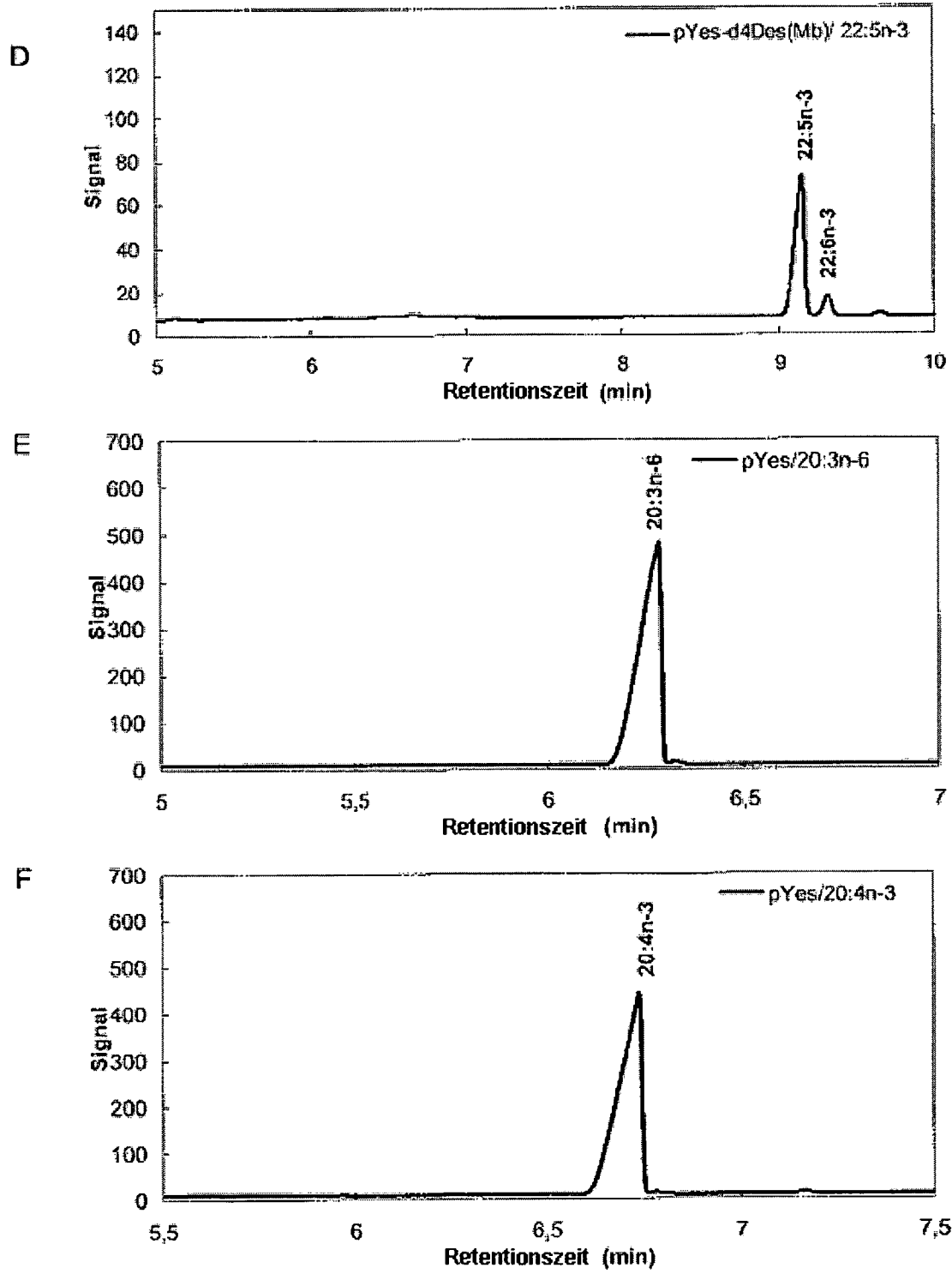


Fig. Forts.

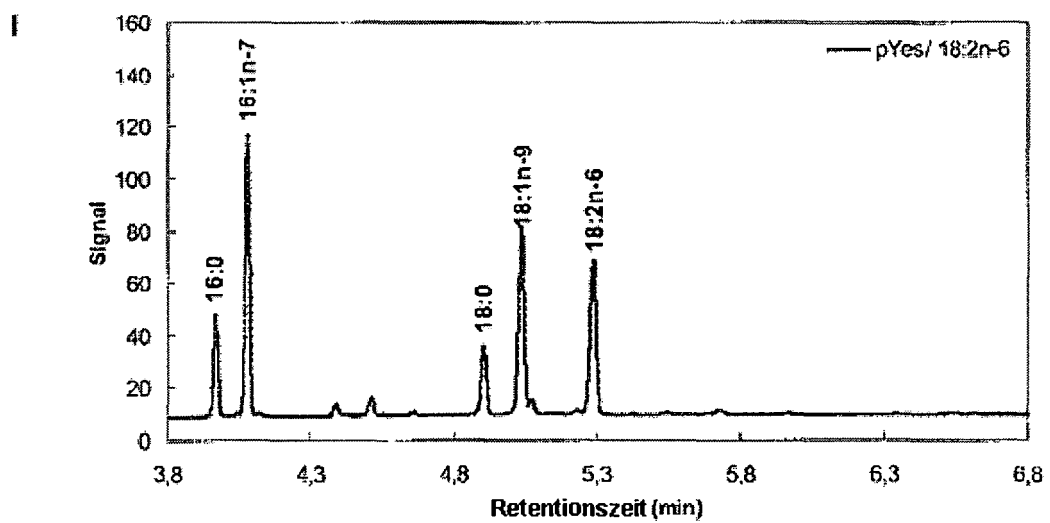
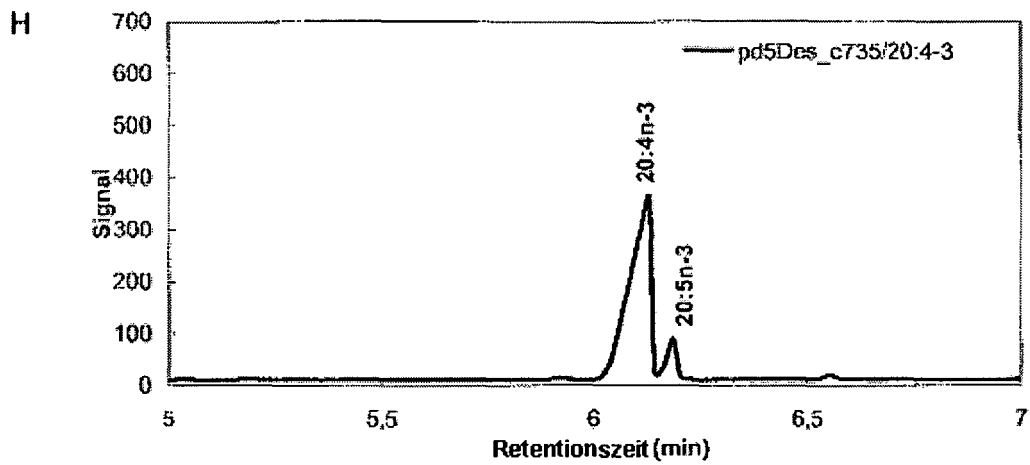
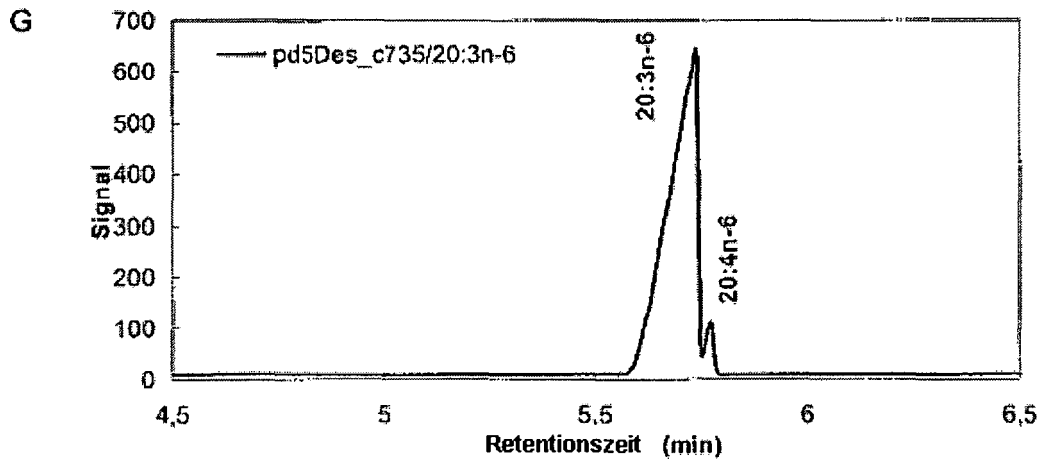


Fig. Forts.

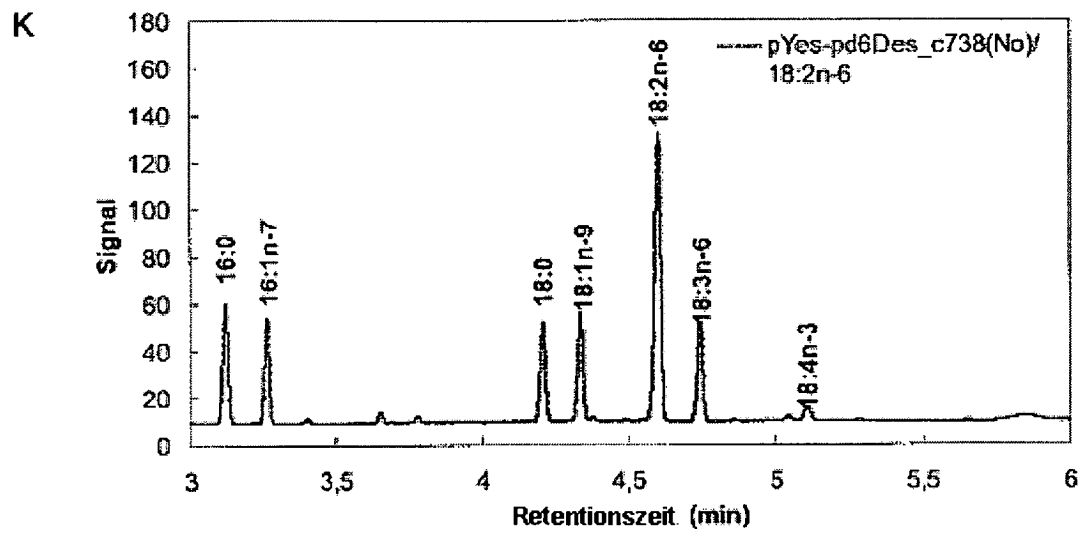
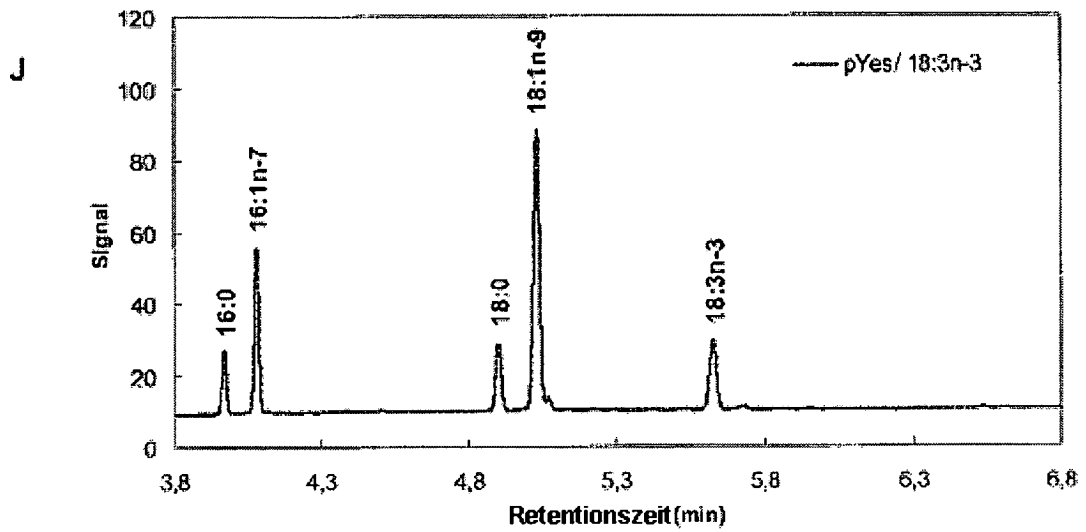


Fig. Forts.

L

