



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 34 849 T2** 2006.12.21

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 781 327 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 34 849.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/11855**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 934 442.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1996/010075**

(86) PCT-Anmeldetag: **25.09.1995**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **04.04.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.07.1997**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **08.03.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **21.12.2006**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12N 9/10** (2006.01)

**C12N 15/63** (2006.01)

**C12P 21/06** (2006.01)

**A61K 38/51** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**314596**            **26.09.1994**    **US**

**320982**            **11.10.1994**    **US**

**530862**            **20.09.1995**    **US**

(73) Patentinhaber:

**Carnegie Institution of Washington, Washington,  
D.C., US; Monsanto Co., Inc., St.Louis, Mo., US**

(74) Vertreter:

**Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU,  
NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**gleich Anmelder**

(54) Bezeichnung: **HERSTELLUNG VON HYDROXYLIERTEN FETTSÄUREN IN GENETISCH VERÄNDERTEN PFLANZEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## TECHNISCHES GEBIET

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft die Identifizierung von Nukleinsäuresequenzen und Nukleinsäure-Konstrukten und damit in Verbindung stehende Verfahren, sowie die Verwendung dieser Sequenzen und Konstrukte, um genetisch modifizierte Pflanzen zum Zwecke der Veränderung der Fettsäurezusammensetzung von pflanzlichen Ölen, Wachsen und verwandten Verbindungen herzustellen.

## DEFINITIONEN

**[0002]** Gegenstand dieser Erfindung ist eine Klasse von Enzymen, die eine Hydroxylgruppe in mehrere verschiedene Fettsäuren einbringen, was zur Herstellung von mehreren verschiedenen Arten von hydroxylierten Fettsäuren führt. Diese Enzyme katalysieren insbesondere die Hydroxylierung von Ölsäure zu 12-Hydroxyölsäure sowie die Hydroxylierung von Icosensäure zu 14-Hydroxyicosensäure. Andere Fettsäuren, wie Palmitoleinsäure oder Erucasäure können ebenfalls Substrate sein. Da es nicht möglich ist, sich auf dieses Enzym durch Hinweis auf ein einzelnes Substrat oder Produkt zu beziehen, wird im Rahmen dieser Anmeldung auf dieses Enzym als kappa-Hydroxylasen Bezug genommen, um klarzustellen, dass das Enzym das Hydroxyl drei Kohlenstoffatome distal (d.h. entfernt vom Carboxylkohlenstoff der Acylkette) von einer Doppelbindung einbringt, die in der Nähe des Zentrums der Acylkette lokalisiert ist.

**[0003]** Die folgenden Fettsäuren sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung: Rizinolsäure, 12-Hydroxy-cis-9-octadecensäure (12OH-18:1<sup>cisΔ9</sup>); Lesquerolsäure, 14-Hydroxy-cis-11-icosensäure (14OH-20:1<sup>cisΔ11</sup>); Densipolsäure, 12-Hydroxy-cis-9,15-octadecadiensäure (12OH-18:2<sup>cisΔ9,15</sup>); Auricolsäure, 14-Hydroxy-cis-11,17-icosadiensäure, (14OH-20:2<sup>cisΔ11,17</sup>); Hydroxyerucasäure, 16-Hydroxy-cis-13-docosensäure (16OH-22:1<sup>cisΔ13</sup>); Hydroxypalmitoleinsäure, 12-Hydroxy-cis-9-hexadecensäure (12OH-16:1<sup>cisΔ9</sup>); Icosensäure (20:1<sup>cisΔ11</sup>). Es wird angemerkt, dass Icosensäure in einigen Ländern Eicosensäure genannt wird.

## HINTERGRUND

**[0004]** Ausführliche Analysen der Fettsäurezusammensetzung von Samenölen von verschiedenen Spezies höherer Pflanzen haben dazu geführt, dass mindestens 33 strukturell verschiedene monohydroxylierte Pflanzenfettsäuren und 12 verschiedene polyhydroxylierte Pflanzenfettsäuren identifiziert wurden, die von einer oder von mehreren Pflanzen-Spezies akkumuliert werden (Überblick in van de Loo et al., 1993). Rizinolsäure, der hauptsächliche Bestandteil des Samenöls der Rizinuspflanze *Rizinus communis* (L.), ist von kommerzieller Bedeutung. Es wurde ein Gen dieser Spezies kloniert, das für eine Fettsäure-Hydroxylase kodiert; dieses Gen wurde dazu verwendet, Rizinolsäure in transgenen Pflanzen einer anderen Spezies zu produzieren. Der wissenschaftliche Beweis, der die Behauptung stützt, wurde 1995 veröffentlicht. Gegenstand dieser Erfindung ist die Verwendung des Rizinus-Hydroxylase-Gens, um damit auch andere hydroxylierte Fettsäuren wie Lesquerolsäure, Densipolsäure, Hydroxypalmitoleinsäure, Hydroxyerucasäure und Auricolsäure in transgenen Pflanzen zu produzieren. Darüber hinaus ist die Identifizierung eines Gens, das für eine homologe Hydroxylase aus *Lesquerella fendleri* kodiert, sowie die Verwendung dieses Gens zur Herstellung dieser hydroxylierten Fettsäuren in transgenen Pflanzen ebenfalls Gegenstand dieser Erfindung.

**[0005]** *Rizinus* ist eine kleinere Ölsamenpflanze. Ungefähr 50 % des Samengewichtes besteht aus Öl (Triacylglycerol), in dem 85 bis 90 % der gesamten Fettsäuren aus der hydroxylierten Fettsäure Rizinolsäure bestehen. Öl, das aus *Rizinus*-Samen gepresst oder extrahiert wurde, hat zahlreiche industrielle Anwendungen, die auf den Eigenschaften basieren, welche von der hydroxylierten Fettsäure herrühren. Die wichtigsten Verwendungen sind die Herstellung von Farben und Lacken, Nylon-artigen synthetischen Polymeren, Harzen, Schmiermitteln und Kosmetika (Atsmon, 1989). Neben dem Öl enthält der *Rizinus*-Samen das extrem toxische Protein Rizin, allergene Proteine sowie das Alkaloid Rizinin. Diese Bestandteile schließen die Verwendung von unbehandeltem Samen-Mehl (nach Ölextraktion) als Viehfutter aus, was normalerweise eine wichtigen ökonomischen Aspekt der Ölsamenverwendung darstellt. Darüber hinaus hat *Rizinus* wegen der wechselhaften Beschaffenheit der *Rizinus*-pflanzen und den fehlenden Aufwendungen bei der Züchtung nur wenige agronomisch vorteilhafte Eigenschaften. Aus der Gesamtschau dieser Gründe wird *Rizinus* in den Vereinigten Staaten nicht mehr angebaut; die Entwicklung einer alternativen, heimischen Bezugsquelle für hydroxylierte Fettsäuren wäre daher attraktiv. Die Herstellung von Rizinolsäure, dem wichtigen Bestandteil des *Rizinus*öls, in einer etablierten Ölsamenpflanze durch genetische Veränderung würde ein besonders wirksames Mittel zur Erzeugung einer heimischen Bezugsquelle darstellen.

**[0006]** Da es keine praktische Bezugsquelle für Lesquerolsäure, Densipolsäure und Auricolsäure aus Pflanzen gibt, die an moderne landwirtschaftliche Verfahren angepasst sind, werden diese Fettsäuren derzeit von der Industrie nicht im großen Maßstab verwendet. Die Fettsäuren würden jedoch ähnlich wie Rizinolsäure verwendet werden, wenn sie in größeren Mengen hergestellt werden könnten und zu Kosten, die denjenigen der anderen aus Pflanzen erhaltenen Fettsäuren ähneln (Smith, 1985). Pflanzen-Spezies, wie bestimmte Spezies der Gattung *Lesquerella*, die einen hohen Anteil dieser Fettsäuren akkumulieren, sind nicht domestiziert worden und werden gegenwärtig nicht als praktische Bezugsquelle für Fettsäuren in Betracht gezogen (Hirsinger, 1989). Diese Erfindung stellt einen nützlichen Schritt zur eventuellen Herstellung dieser und anderer hydroxylierter Fettsäuren in transgenen Pflanzen von landwirtschaftlicher Bedeutung dar.

**[0007]** Die taxonomischen Beziehungen zwischen Pflanzen mit ähnlichen oder identischen Arten von ungewöhnlichen Fettsäuren sind untersucht worden (van de Loo et al., 1993). In einigen Fällen treten bestimmte Fettsäuren vorwiegend oder ausschließlich in verwandten Taxa auf. In anderen Fällen scheint es keine direkte Verbindung zwischen taxonomischer Verwandtschaft und dem Auftreten von ungewöhnlichen Fettsäuren zu geben. In diesem Zusammenhang wurde kürzlich Rizinolsäure in 12 Gattungen aus 10 Familien identifiziert (zusammengefasst in van de Loo et al., 1993). Es scheint daher, dass die Fähigkeit zur Synthese hydroxylierter Fettsäuren während der Radiation der Angiospermen mehrere Male unabhängig aufgetreten ist. Dies deutete für uns darauf hin, dass die Enzyme, welche Hydroxyl-Gruppen in Fettsäuren einbringen, durch geringfügige Modifikationen eines verwandten Enzyms entstanden sind. Wie vorliegend tatsächlich gezeigt wird, ist die Sequenzähnlichkeit zwischen  $\Delta 12$ -Fettsäure-Desaturasen und der kappa-Hydroxylase aus *Rizinus* so hoch, dass es auf Basis der Hinweise in der schriftlichen Literatur nicht möglich ist, eindeutig zu bestimmen, ob ein bestimmtes Enzym eine Desaturase oder eine Hydroxylase ist. Dementsprechend zeigt die Patentanmeldung (WO 94/11516), die behauptet, die Isolierung und Verwendung von  $\Delta 12$ -Fettsäure-Desaturasen zu lehren, nicht, wie man zwischen einer Hydroxylase und einer Desaturase unterscheiden kann. Da es für die genetische Manipulation von Pflanzenölen wichtig ist, diese Aktivitäten unterscheiden zu können, ist die Brauchbarkeit dieser Anmeldung auf diejenigen Beispiele beschränkt, in denen ein direkter experimenteller Beweis (z.B. eine veränderte Fettsäurezusammensetzung in transgenen Pflanzen) geliefert wird, der die Zuweisung zu einer Funktion stützt. Ein Verfahren zur Unterscheidung zwischen Fettsäure-Desaturasen und Fettsäure-Hydroxylasen auf Basis der Aminosäuresequenz des Enzyms ist ebenfalls Gegenstand dieser Erfindung.

**[0008]** Ein Merkmal hydroxylierter oder anderer ungewöhnlicher Fettsäuren ist, dass sie im Allgemeinen auf Samen-Triacylglycerole beschränkt sind, die weitgehend von den polaren Lipiden durch unbekannte Mechanismen ausgeschlossen werden (Battey und Ohlrogge, 1989; Prasad et al., 1987). Dies ist sehr verblüffend, da Diacylglycerol sowohl ein Vorläufer für Triacylglycerol als auch für polare Lipide ist. Von *Rizinus*-Mikrosomen wurden einige Hinweise darauf erhalten, dass der Pool der Rizinoleoylenthaltenden polaren Lipiden durch eine Präferenz der Diacylglycerol-Acyltransferase für Rizinoleat-enthaltende Diacylglycerole minimiert ist (Bafor et al., 1991). Analysen von vegetativen Geweben haben zu einigen Berichten über ungewöhnliche Fettsäuren geführt, die sich von denen unterscheiden, die in der Cuticula (cuticle) auftreten. Die Cuticula enthält verschiedene hydroxylierte Fettsäuren, die miteinander verestert sind, wobei ein Polyester mit hohem Molekulargewicht gebildet wird, der strukturellen Aufgaben dient. Es gibt eine kleine Anzahl von anderen Ausnahmen, in denen ungewöhnliche Fettsäuren in nicht-Samengeweben vorgefunden werden.

**[0009]** Die Biosynthese von Rizinolsäure aus Ölsäure im sich entwickelnden Endosperm von *Rizinus* (*Ricinus communis*) wurde durch eine Vielzahl von Verfahren untersucht. Morris, (1967) zeigte in Doppel-Markierungsstudien, dass die Hydroxylierung unmittelbar durch Hydroxylsubstitution und nicht über einen ungesättigtes Intermediat, ein Keto-Intermediat oder ein Epoxy-Intermediat verläuft. Die Hydroxylierung unter Verwendung von Oleyl-CoA als Vorläufer kann in ungereinigten Präparationen oder Mikrosomen gezeigt werden, wobei jedoch die Aktivität in Mikrosomen nicht stabil und veränderlich ist, und die Isolierung von Mikrosomen einen beträchtlichen und zuweilen sogar vollständigen Verlust der Aktivität mit sich bringt (Galliard und Stumpf, 1966; Moreau und Stumpf, 1981). Ölsäure kann Oleyl-CoA als Vorläufer ersetzen, jedoch nur in Gegenwart von CoA,  $Mg^{2+}$  und ATP (Galliard und Stumpf, 1966), was darauf verweist, dass die Aktivierung zu einem Acyl-CoA notwendig ist. Es konnte jedoch keine Radioaktivität in Rizinoleoyl-CoA (Moreau und Stumpf, 1981) nachgewiesen werden. Diese und andere kürzlich gemachten Beobachtungen (Bafor et al., 1991) sind als Beleg interpretiert worden, dass das Substrat für die *Rizinus*-Oleat-Hydroxylase Ölsäure ist, die mit Phosphatidylcholin oder einem anderen Phospholipid verestert ist.

**[0010]** Die Hydroxylase ist empfindlich gegenüber Cyanid und Azid, und eine Dialyse gegen Metall-Chelatoren verringert die Aktivität, welche durch Zugabe von  $FeSO_4$  wieder hergestellt werden kann, was darauf verweist, dass Eisen an der Enzymaktivität beteiligt ist (Galliard und Stumpf, 1966). Die Synthese von Rizinolsäure erfordert molekularen Sauerstoff (Galliard und Stumpf, 1966; Moreau und Stumpf 1981) und NAD(P)H, um

Cytochrom b5 zu reduzieren, von dem man annimmt, dass es sich um den intermediären Elektronendonator der Hydroxylasereaktion handelt (Smith et al., 1992). Kohlenstoffmonoxid inhibiert die Hydroxylierung nicht, was darauf verweist, dass Cytochrom P450 nicht beteiligt ist (Galliard und Stumpf, 1966; Moreau und Stumpf, 1981). Daten einer Untersuchung zur Substratspezifität der Hydroxylase zeigen, dass alle Substratparameter (d.h. Kettenlänge und Doppelbindungsposition in Bezug auf die beiden Enden) wichtig sind; Abweichungen hinsichtlich dieser Parametern verursachen eine relativ zur Ölsäure verringerte Aktivität (Howling et al., 1972). Die Position, an der das Hydroxyl eingebracht wurde, wurde jedoch durch den Teil mit der Doppelbindung bestimmt, und liegt immer 3 Kohlenstoffatome distal. Das Acyl-Hydroxylase-Enzym aus Rizinus kann somit abhängig von der Verfügbarkeit von Substanzen eine Familie von verschiedenen hydroxylierten Fettsäuren produzieren. Das Enzym wird daher der Einfachheit halber im Rahmen der vorliegenden Anmeldung als kappa-Hydroxylase bezeichnet (und nicht als Oleat-Hydroxylase), um auf die breite Substratspezifität zu verweisen.

**[0011]** Die kappa-Hydroxylase aus Rizinus weist zahlreiche oberflächliche Ähnlichkeiten mit den mikrosomalen Fettsäure-Desaturasen auf (Browse und Somerville, 1991). Pflanzen verfügen über eine mikrosomale Oleat-Desaturase, die an der Position  $\Delta 12$  aktiv ist. Das Substrat dieses Enzyms (Schmidt et al., 1993) und das Substrat der Hydroxylase (Bafor et al., 1991) scheint eine Fettsäure zu sein, die mit der sn-2-Position von Phosphatidylcholin verestert ist. Wenn Oleat das Substrat ist, tritt die Modifikation an derselben Position ( $\Delta 12$ ) in der Kohlenstoffkette auf und erfordert dieselben Cofaktoren, nämlich Elektronen von NADH über Cytochrom b<sub>5</sub> und molekularen Sauerstoff. Keines der Enzyme wird durch Kohlenstoffmonoxid, dem charakteristischen Inhibitor der Cytochrom P450-Enzyme, inhibiert (Moreau und Stumpf, 1981).

**[0012]** Es scheint keine veröffentlichten biochemischen Studien über die Eigenschaften des Hydroxylase-Enzyms (der Hydroxylase-Enzyme) in *Lesquerella* zu geben.

**[0013]** WO-A-93/11245 und WO-A-94/11516 offenbaren eine Reihe von Nukleinsäurefragmenten, die für Fettsäure-Desaturasen oder für mit Fettsäure-Desaturasen verwandte Enzyme kodieren, zur Herstellung von transgenen Pflanzen, die in der Lage sind, Öle mit veränderten Mengen an ungesättigten Fettsäuren zu produzieren.

#### Konzeptionelle Basis der Erfindung

**[0014]** Ein cDNA-Klon aus Rizinus kann für die Herstellung von Rizinolsäure in transgenen Pflanzen verwendet werden. Wie oben erwähnt, haben biologische Untersuchungen anderer vorgeschlagen, dass die Rizinus-Hydroxylase keine strikte Spezifität für Ölsäure aufweisen könnte, sondern auch die Hydroxylierung anderer Fettsäuren, wie Icosensäure (20:1<sup>cis $\Delta 11$</sup> ) katalysieren könnte (Howling et al., 1972). Basierend auf diesen Studien würde man erwarten, dass die Expression der Rizinus-Hydroxylase in transgenen Pflanzen von Spezies wie *Brassica napus* und *Arabidopsis thaliana*, die Fettsäuren wie Icosensäure (20:1<sup>cis $\Delta 11$</sup> ) und Erucasäure (13-Docosensäure; 22:1<sup>cis $\Delta 13$</sup> ) akkumulieren, aufgrund der Aktivität der Hydroxylase gegenüber diesen Fettsäuren zur Akkumulierung einiger der hydroxylierten Derivate dieser Fettsäuren führt. Wir haben nunmehr einen weiteren direkten Beleg für eine solche Behauptung erhalten, wobei der Beleg auf der Produktion von Rizinol-, Lesquerol-, Densipol-, und Auricol-Fettsäure in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen basiert und vorliegend als Beispiel 1 eingefügt wurde.

**[0015]** Der Rizinus-Hydroxylase-Klon und die Rizinus-Hydroxylase-Sequenzen, die von diesem erhalten werden, könnten dazu verwendet werden, andere Hydroxylase-Klone von Pflanzen-Spezies wie *Lesquerella fendleri* zu erhalten, von denen bekannt ist, dass sie hydroxylierte Fettsäuren in Samenölen akkumulieren. Wir haben ein Beispiel für eine solche Verwendung zur Isolierung eines neuen Hydroxylase-Gens von *Lesquerella fendleri* bereitgestellt.

**[0016]** Im Hinblick auf den hohen Grad an Sequenzähnlichkeit zwischen  $\Delta 12$ -Fettsäure-Desaturasen und der Rizinus-Hydroxylase (van de Loo et al., 1995) muss die Gültigkeit von Ansprüchen für die Verwendung von Desaturase- oder Hydroxylase-Genen oder davon abgeleiteten Sequenzen zur Identifizierung von Genen mit identischer Funktion aus anderen Arten mit Skepsis betrachtet werden. In dieser Anmeldung wird ein Verfahren gelehrt, durch das Hydroxylase-Gene von Desaturasen unterschieden werden können, und es werden Verfahren beschrieben, durch die  $\Delta 12$ -Desaturasen durch Modifikation des Gens, welches für die Desaturasen kodiert, zu Hydroxylasen umgewandelt werden können. Eine mechanistische Basis für die ähnlichen Reaktionsmechanismen von Desaturasen und Hydroxylasen wurde in einer früheren Patentanmeldung dargestellt. Die vorliegenden Belege verweisen darauf, dass die Fettsäure-Desaturasen einen ähnlichen Reaktionsmechanismus wie das bakterielle Enzym Methan-Monooxygenase aufweisen, das eine Reaktion katalysiert, bei der

es zu einem Transfer eines Sauerstoffatoms ( $\text{CH}_4 \rightarrow \text{CH}_3\text{OH}$ ) kommt (van de Loo et al., 1993). Der Cofaktor des Hydroxylase-Bestandteils der Methan-Monooxygenase wird als  $\mu$ -Oxo-verbrücktes Di-Eisencluster ( $\text{FeO-Fe}$ ) bezeichnet. Die zwei Eisenatome des  $\text{FeOFe}$ -Clusters sind durch Stickstoff- oder Sauerstoffatome gebunden (liganded), die von Proteinen stammen, und sie sind über das kovalent-verbrückende Sauerstoffatom streng Redoxgekoppelt. Das  $\text{FeOFe}$ -Cluster akzeptiert zwei Elektronen, die es zum Di-Eisen (diferrous)-Zustand reduzieren, bevor die Bindung von Sauerstoff erfolgt. Bei der Bindung von Sauerstoff ist es wahrscheinlich, dass auch eine heterolytische Spaltung erfolgt, die zu einer hochvalenten Oxo-Eisen-reaktiven Spezies führt, welche durch Resonanz-Umlagerung stabilisiert wird, die in dem streng gekoppelten  $\text{FeOFe}$ -Cluster möglich sind. Der stabilisierte hochvalente Oxo-Eisen-Zustand der Methan-Monooxygenase ist in der Lage, Protonen von Methan zu extrahieren, gefolgt von einem Sauerstofftransfer, was zu Methanol führt. Es wurde gezeigt, dass der  $\text{FeOFe}$ -Cofaktor unmittelbar für die Fettsäuremodifikation bei Pflanzen relevant ist, indem gezeigt wurde, dass die Stearoyl-ACP-Desaturase aus Rizinus diese Art von Cofaktor enthält (Fox et al., 1993).

**[0017]** Auf Basis der obigen Überlegungen haben wir angenommen, dass die Rizinus-Oleat-Hydroxylase eine strukturell modifizierte Fettsäure-Desaturase ist, wobei dies auf drei Argumenten basiert. Das erste Argument betrifft die taxonomische Verteilung von Pflanzen, die Rizinolsäure enthalten. Rizinolsäure wird in 12 Gattungen von 10 Familien höherer Pflanzen gefunden (zusammengefasst in van de Loo et al., 1993). Daher werden Pflanzen, in denen Rizinolsäure auftritt, im gesamten Reich der Pflanzen gefunden, wobei jedoch nahe Verwandte dieser Pflanzen die ungewöhnliche Fettsäure nicht enthalten. Dieses Muster verweist darauf, dass die Fähigkeit Rizinolsäure zu synthetisieren, mehrere Male unabhängig entstanden ist (und verloren wurde) und somit eine recht kürzlich stattgefundenen Verzweigung darstellt. Mit anderen Worten ist die Fähigkeit Rizinolsäure zu synthetisieren schnell entstanden, was darauf hindeutet, dass eine verhältnismäßig geringfügige genetische Änderung in der Struktur des Ausgangsenzyms notwendig war, um dies zu erreichen.

**[0018]** Das zweite Argument ist, dass zahlreiche biochemische Eigenschaften der kappa-Hydroxylase aus Rizinus denen von mikrosomalen Desaturasen ähneln, wie oben dargestellt wird (z.B. wirken beide bevorzugt auf Fettsäuren, die mit der sn-2-Position von Phosphatidylcholin verestert sind, beide verwenden Cytochrom b5 als intermediären Elektronendonator, beide werden durch Cyanid gehemmt, beide benötigen molekularen Sauerstoff als Substrat, von beiden wird angenommen, dass sie im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind).

**[0019]** Das dritte Argument stammt aus der obigen Diskussion bezüglich der Oxygenase-Cofaktoren, in der vorgeschlagen wird, dass die Membran-gebundenen Fettsäure-Desaturasen aus Pflanzen einen  $\mu$ -Oxo-verbrückten Cofaktor vom Di-Eisen-Cluster-Typ aufweisen, und dass solche Cofaktoren in der Lage sind, sowohl die Fettsäure-Desaturierungen als auch die Fettsäure-Hydroxylierungen abhängig von den Elektronen- und Struktur-Eigenschaften des Aktivitätszentrums des Proteins zu katalysieren.

**[0020]** In der Zusammenschau dieser drei Argumente wurde angenommen, dass die kappa-Hydroxylase aus dem Endosperm von Rizinus homolog zu der mikrosomalen Oleat- $\Delta$ 12-Desaturase ist, die in allen Pflanzen gefunden wird. Der Beleg, der diese Hypothese unterstützt, ist offenbart worden.

**[0021]** Mehrere Gene, die für mikrosomale  $\Delta$ 12-Desaturasen aus verschiedenen Spezies kodieren, sind kürzlich kloniert worden (Okuley et al., 1994), und wesentliche Informationen bezüglich der Struktur dieser Enzyme sind nunmehr bekannt. Somit wird in der folgenden Erfindung gezeigt, wie die strukturellen Informationen bezüglich der Fettsäure-Desaturasen zu verwenden sind, um kappa-Hydroxylase-Gene gemäß der Erfindung zu isolieren. Dieses Beispiel zeigt das Verfahren, durch das jedes Gen für eine Kohlenstoffmonoxid-insensitive pflanzliche Fettsäure-Hydroxylase durch den Fachmann identifiziert werden kann.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

**[0022]** Zusammenfassend gesagt stellt die vorliegende Erfindung ein isoliertes Nukleinsäurefragment bereit, das eine Nukleinsäuresequenz umfasst, welche für eine Fettsäure-Hydroxylase mit einer Aminosäure-Identität von 60 % oder mehr in Bezug auf die in SEQ ID NO: 4 dargestellte Aminosäuresequenz kodiert.

**[0023]** Die Aminosäuresequenz-Identität ist vorzugsweise 90 % oder mehr in Bezug auf die SEQ ID NO: 4 dargestellte Aminosäuresequenz.

**[0024]** Eine solche Aminosäure-Identität kann 100 % betragen.

**[0025]** Die Erfindung umfasst ein isoliertes Nukleinsäurefragment, das für ein Polypeptid kodiert, welches Fettsäure-Hydroxylase-Aktivität aufweist und eine Nukleinsäuresequenz-Identität von 90 % oder mehr (wahlweise 100 %) in Bezug auf die in SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 dargestellte Nukleotidsequenz aufweist.

**[0026]** Bei dem isolierten Nukleinsäurefragment kann es sich um ein solches handeln, das aus einer Öl-produzierenden Pflanzen-Spezies isoliert ist.

**[0027]** Die Erfindung umfasst ein chimäres Gen, das in der Lage ist, veränderte Mengen Rizinolsäure in einer transformierten Pflanzenzelle zu bewirken, wobei das chimäre Gen ein wie oben beschriebenes erfindungsgemäßes Nukleinsäurefragment umfasst, wobei das Fragment in funktionsfähiger Weise mit geeigneten regulatorischen Sequenzen verknüpft ist.

**[0028]** Die Erfindung umfasst ein chimäres Gen, das in der Lage ist, veränderte Mengen Lesquerolsäure in einer transformierten Pflanzenzelle zu bewirken, wobei das chimäre Gen ein wie oben beschriebenes erfindungsgemäßes Nukleinsäurefragment umfasst, wobei das Fragment in funktionsfähiger Weise mit geeigneten regulatorischen Sequenzen verknüpft ist.

**[0029]** Die Erfindung umfasst ein chimäres Gen, das in der Lage ist, veränderte Mengen an Fettsäuren in einer transformierten Pflanzenzelle zu bewirken, wobei das chimäre Gen ein wie oben beschriebenes erfindungsgemäßes Nukleinsäurefragment umfasst, wobei das Fragment in funktionsfähiger Weise mit geeigneten regulatorischen Sequenzen verknüpft ist.

**[0030]** Die Erfindung umfasst Pflanzen, die irgendeines dieser chimären Gene umfassen, z.B. Raps, Crambe, Brassica juncea, Brassica nigra, Sumpflinse, Flachs, Sonnenblume, Distel, Baumwolle, Cuphea, Sojabohne, Erdnuss, Kokosnuss, Ölpalme oder Mais.

**[0031]** Bei dem erfindungsgemäßen isolierten Nukleinsäurefragment kann es sich um ein solches handeln, das von Ricinus communis (L.) (Rizinus) erhältlich ist.

**[0032]** Die Erfindung umfasst ein Verfahren zur Herstellung von Samenöl, das veränderte Mengen an hydroxylierten Fettsäuren enthält, bei dem man:

- (a) eine Pflanzenzelle einer Öl-produzierenden Spezies mit einem chimären Gen transformiert, das eine wie oben beschriebene erfindungsgemäße isolierte Nukleinsäure enthält;
- (b) ausgehend von den transformierten Pflanzenzellen von Schritt (a) fertile Pflanzen anzüchtet;
- (c) Nachkommen-Samen von den fertilen Pflanzen von Schritt (b) auf die gewünschten Mengen hydroxylierter Fettsäuren untersucht; und
- (d) die Nachkommen-Samen von Schritt (c) weiterverarbeitet, um Samenöl zu erhalten, das veränderte Mengen ungesättigter Fettsäuren enthält.

**[0033]** Die Nutzpflanze kann ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus Raps, Crambe, Brassica juncea, Canola, Flachs, Sonnenblume, Distel, Baumwolle, Cuphea, Sojabohne, Erdnuss, Kokosnuss, Ölpalme und Mais.

**[0034]** Die Erfindung umfasst ein Triglyceridöl aus einer Pflanze, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Raps, Crambe, Brassica juncea, Canola, Flachs, Sonnenblume, Distel, Baumwolle, Cuphea, Sojabohne, Erdnuss, Kokosnuss, Ölpalme oder Mais, wobei die Fettsäurezusammensetzung des Öls dahingehend modifiziert wurde, dass sie hydroxylierte Fettsäuren enthält, durch ein Verfahren, bei dem man eine Pflanzenzelle, die ein in ihr Genom integriertes DNA-Konstrukt aufweist, welches eine für eine Hydroxylase kodierende Sequenz gemäß der vorliegenden Erfindung umfasst, unter Bedingungen anzüchtet, die die Transkription und Translation der besagten Pflanzen-Hydroxylase in den Pflanzenzellen erlauben.

**[0035]** Die Erfindung umfasst ein Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäurefragmenten, die für eine Fettsäure-Hydroxylase kodieren, bei dem man:

- (a) SEQ ID NO: 4 und andere Fettsäure-Hydroxylase-Sequenzen und Fettsäure-Desaturasasen vergleicht;
- (b) konservierte Sequenzen von 4 oder mehr Aminosäuren, die in Schritt (a) erhalten werden, identifiziert;
- (c) auf Basis der in Schritt (b) identifizierten, konservierten Sequenzen degenerierte Oligomere erstellt;
- (d) die degenerierten Oligomere von Schritt (c) verwendet, um durch Sequenz-abhängige Methoden Sequenzen zu isolieren, die für Fettsäure-Hydroxylasen kodieren;
- (e) ausgehend von der Nukleotidsequenz des Gens die abgeleitete Aminosäuresequenz des kodierten Genprodukts erhält; und

(f) durch Analyse von Aminosäuresequenz-Unterschieden zwischen Fettsäure-Desaturasen und Fettsäure-Hydroxylasen Hydroxylase-Gene von einem Desaturase-Gen unterscheidet.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0036] Die [Fig. 1A–D](#) zeigen die Massenspektren von Hydroxyfettsäure-Standards ([Fig. 1A](#), O-TMS-Methyl-Rizinoleat; [Fig. 1B](#), O-TMS-Methyl-Densipoleat; [Fig. 1C](#), O-TMS-Methyl-Lesqueroleat; und [Fig. 1D](#), O-TMS-Methyl-Auricoleat).

[0037] [Fig. 2](#) zeigt das Fragmentierungsmuster von Trimethylsilylierten Methylestern von Hydroxyfettsäuren.

[0038] [Fig. 3A](#) zeigt das Gaschromatogramm von Fettsäuren, die aus Samen von Wildtyp-Arabidopsis-Pflanzen extrahiert wurden. [Fig. 3B](#) zeigt das Gaschromatogramm von Fettsäuren, die aus Samen von transgenen Arabidopsis-Pflanzen extrahiert wurden, die das *fah12*-Hydroxylase-Gen enthielten. Die Zahlen verweisen auf die folgenden Fettsäuren: [1] 16:0; [2] 18:0; [3] 18:1<sup>cisΔ9</sup>; [4] 18:2<sup>cisΔ9,12</sup>; [5] 20:0; [6] 20:1<sup>cisΔ11</sup>; [7] 18:3<sup>cisΔ9,12,15</sup>; [8] 22:1<sup>cisΔ13</sup>; m [9] 24:1<sup>cisΔ13</sup>; [10] Rizinolsäure [11] Densipolsäure, [12] Lesquerolsäure; [13] Auricolsäure.

[0039] Die [Fig. 4A–D](#) zeigen die Massenspektren von neuen Fettsäuren, die in Samen von transgenen Pflanzen gefunden wurden. [Fig. 4A](#) zeigt das Massenspektrum des Peaks **10** aus [Fig. 3B](#). [Fig. 4B](#) zeigt das Massenspektrum des Peaks **11** aus [Fig. 3B](#). [Fig. 4C](#) zeigt das Massenspektrum von Peak **12** aus [Fig. 3B](#). [Fig. 4D](#) zeigt das Massenspektrum von Peak **14** aus [Fig. 3B](#).

[0040] [Fig. 5](#) zeigt die Nukleotidsequenz von pLesq2 (SEQ ID NO: 1).

[0041] [Fig. 6](#) zeigt die Nukleotidsequenz von pLesq3 (SEQ ID NO: 2).

[0042] [Fig. 7](#) zeigt einen Northernblot von Gesamt-RNA aus Samen von *L. fendleri*, die mit pLesq2 oder pLesq3 als Sonde untersucht wurden. S verweist darauf, dass die RNA aus Samen stammt; L verweist darauf, dass die RNA aus Blättern stammt.

[0043] Die [Fig. 8A–B](#) zeigen die Nukleotidsequenz eines genomischen Klons, der für pLesq-HYD (SEQ ID NO: 3) kodiert sowie die davon abgeleitete Aminosäuresequenz des Hydroxylase-Enzyms, das durch dieses Gen kodiert wird (SEQ ID NO: 4).

[0044] Die [Fig. 9A–B](#) zeigen verschiedene Sequenz-Alignments von abgeleiteten Aminosäuresequenzen für kappa-Hydroxylasen und mikrosomale Δ12-Desaturasen. Die Abkürzungen sind die Folgenden: Rcfah12, fah12, Hydroxylase-Gen aus *R. communis* (van de Loo et al., 1995); lffah12, kappa-Hydroxylase-Gen aus *L. fendleri*; Atfad2, fad2, Desaturase aus *Arabidopsis thaliana* (Okuley et al., 1994); Gmfad2-1, fad2 Desaturase aus *Glycine max* (GenBank Zugriffsnummer L43920); Gmfad2-2, fad2 Desaturase aus *Glycine max* (GenBank Zugriffsnummer L43921); Zmfad2, fad2 Desaturase aus *Zea mays* (WO 94/11516); Rcfad2, Fragment der fad2 Desaturase aus *R. communis* (WO 94/11516); Bnfad2, fad2 Desaturase aus *Brassica napus* (WO 94/11516); LFFAH12.AMI, SEQ ID NO: 4; FAH12.AMI, SEQ ID NO: 5; ATFAC2.AMI, SEQ ID NO: 6; BNFAD2.AMI, SEQ ID NO: 7; GMFAD2-1.AMI, SEQ ID NO: 8; GMFAD-2.AMI, SEQ ID NO: 9; ZMFAD2.AMI, SEQ ID NO: 10; und RCFAD2.AMI, SEQ ID NO: 11.

[0045] [Fig. 10](#) zeigt einen Southernblot von genomischer DNA aus *L. fendleri*, die mit pLesq-HYD als Sonde untersucht wurde. E=EcoRI, H=HindIII, X=XbaI.

[0046] [Fig. 11](#) zeigt eine Kartierung des binären Ti-Plasmids pSLJ44024.

[0047] Wie oben dargestellt ist, werden gemäß einer ersten Ausführungsform bestimmte rekombinante DNA-Konstrukte bereitgestellt, die für die Transkription oder für die Transkription und Translation (Expression) der kappa-Hydroxylase-Gensequenz aus Pflanzen sorgen können. Es sind insbesondere Konstrukte bevorzugt, die zur Transkription oder zur Transkription und Translation in Pflanzen-Wirtszellen befähigt sind. Solche Konstrukte können eine Vielzahl von regulatorischen Regionen umfassen, einschließlich transkriptionaler Initiationsregionen, die von Genen erhalten werden, die vorzugsweise im Samengewebe von Pflanzen exprimiert werden. Gemäß eines zweiten Aspekts werden solche Konstrukte in Pflanzenzellen bereitgestellt, insbesondere in Pflanzenzellen, die eine exprimierte Pflanzenkappa-Hydroxylase umfassen.

[0048] Eine solche Pflanzen-kappa-Hydroxylase kann in einer Wirtszelle oder in Nachkommen derselben mit-

tels der Expression eines Konstrukts in der Zelle produziert werden. Zellen, die eine Pflanzen-kappa-Hydroxylase als Ergebnis der Produktion der für die Pflanzen-kappa-Hydroxylase kodierenden Sequenz umfassen, werden vorliegend ebenfalls vorgeschlagen.

**[0049]** Gemäß einer weiteren Ausführungsform werden Verfahren zur Verwendung einer für eine Pflanzen-kappa-Hydroxylase kodierenden DNA-Sequenz zur Modifikation eines Teils der hydroxylierten Fettsäuren, die in einer Zelle gebildet werden, insbesondere einer Pflanzenzelle, bereitgestellt. Pflanzenzellen, die eine solche modifizierte Zusammensetzung bezüglich der hydroxylierten Fettsäuren aufweisen, werden vorliegend ebenfalls vorgeschlagen.

**[0050]** Pflanzen-kappa-Hydroxylase-Proteine und damit verwandte Sequenzen, einschließlich Aminosäure- und Nukleinsäuresequenzen werden vorgeschlagen. Die vorliegend beispielhaft angeführte Pflanzen-kappa-Hydroxylase umfasst eine Fettsäure-Hydroxylase aus *Lesquerella fendleri*. Diese beispielhaft angeführte Fettsäure-Hydroxylase kann verwendet werden, um andere erfindungsgemäße Pflanzen-Fettsäure-Hydroxylasen zu erhalten.

**[0051]** Gemäß eines weiteren Aspektes dieser Erfindung wird eine Nukleinsäuresequenz beschrieben, die die Samen-spezifische Expression einer für ein assoziiertes Polypeptid kodierenden Sequenz steuert. Die Verwendung dieser Nukleinsäuresequenz oder von Fragmenten, die sich davon ableiten, um eine Samenspezifische Expression einer beliebigen kodierenden Sequenz in höheren Pflanzen zu erhalten, wird vorliegend vorgeschlagen.

#### DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

**[0052]** Eine erfindungsgemäße genetisch transformierte Pflanze, die hydroxylierte Fettsäuren akkumuliert, kann durch Expression der doppelsträngigen DNA-Moleküle, die in dieser Anmeldung beschrieben werden, erhalten werden.

**[0053]** Eine erfindungsgemäße Pflanzen-Fettsäure-Hydroxylase umfasst eine beliebige Aminosäuresequenz (wie beispielsweise ein Protein, Peptid oder Peptidfragment oder Nukleinsäuresequenzen, die für solche Polypeptide kodieren), die aus einer Pflanzen-Bezugsquelle erhältlich ist und die Fähigkeit zeigt, die Herstellung von Rizinolsäure, Lesquerolsäure, Hydroxyerucasäure (16-Hydroxy-cis-13-docosensäure) oder Hydroxypalmitoleinsäure (12-Hydroxy-cis-9-hexadecensäure) aus CoA, ACP oder Lipidgebundenen Monoen-Fettsäuresubstraten unter für ein Pflanzen-Enzym reaktiven Bedingungen zu katalysieren. Mit "für ein Enzym reaktive Bedingungen" ist gemeint, dass sämtliche erforderlichen Bedingungen in einer Umgebung verfügbar sind (d.h. solche Faktoren wie Temperatur, pH, Fehlen von inhibierenden Substanzen), die dem Enzym seine Funktionsfähigkeit erlauben.

**[0054]** Die bevorzugte Aktivität einer Pflanzen-Fettsäure-Hydroxylase gegenüber einem bestimmten Fettsäuresubstrat wird durch Vergleich der Produktmengen an hydroxylierten Fettsäure, die für verschiedene Fettsäuresubstrate erhalten werden, bestimmt. Beispielsweise ist mit "Oleat bevorzugend" gemeint, dass die Hydroxylase-Aktivität der Enzympräparation eine Präferenz für Oleat-enthaltende Substrate im Vergleich mit anderen Substraten zeigt. Obwohl das genaue Substrat für die Fettsäure-Hydroxylase aus *Rizinus* nicht bekannt ist, wird angenommen, dass es sich um einen einfach ungesättigten Fettsäurerest handelt, der mit einem Phospholipid wie Phosphatidylcholin verestert ist. Es ist jedoch auch möglich, dass die einfach ungesättigten Fettsäuren mit Phosphatidylethanolamin verestert sind; Phosphatidsäure oder ein neutrales Lipid wie Diacylglycerol oder ein Coenzym A-Thioester könnten ebenfalls Substrate sein. Wie oben angemerkt, wurde eine signifikante Aktivität in radioaktiven Markierungsuntersuchungen beobachtet, in denen andere Fettsäuresubstrate als Oleate verwendet wurden (Howling et al., 1972), was darauf verweist, dass die Substratspezifität für eine Familie von verwandten Fettsäure-Verbindungen existiert. Da die Hydroxylase aus *Rizinus* die Hydroxy-Gruppen 3 Kohlenstoffatome von einer Doppelbindung entfernt einbringt, proximal zum Methyl-Kohlenstoff der Fettsäure, haben wir dieses Enzym der Einfachheit halber als kappa-Hydroxylase bezeichnet. Wir glauben interessanterweise, dass die *Rizinus*-kappa-Hydroxylase zur Herstellung von 12-Hydroxy-9-octadecensäure (*Rizino*leat), 12-Hydroxy-9-hexadecensäure, 14-Hydroxy-11-eicosensäure, 16-Hydroxy-13-docosensäure, 9-Hydroxy-6-octadecensäure verwendet werden könnte, indem man sie in Pflanzen-Spezies exprimiert, die die nicht-hydroxylierten Vorstufen produzieren. Wir streben ferner die Herstellung von zusätzlich modifizierten Fettsäuren, wie 12-Hydroxy-9,15-octadecadiensäure an, die aus der Desaturierung von hydroxylierten Fettsäuren (z.B. 12-Hydroxy-9-octadecensäure in diesem Beispiel) resultieren.

**[0055]** Wir nehmen ferner an, dass zukünftige Fortschritte in der Pflanzengenetik zur Herstellung von Subst-

ratfettsäuren wie Icosensäureester und Palmitoleinsäureester in Pflanzen führen werden, die normalerweise solche Fettsäuren nicht akkumulieren. Wir nehmen ferner an, dass die vorliegend beschriebene Erfindung im Zusammenhang mit solchen künftigen Verbesserungen verwendet werden kann, um die erfindungsgemäßen hydroxylierten Fettsäuren in beliebigen Pflanzen-Spezies herzustellen, die geeignet sind, die genetische Modifikation zu steuern. Daher ist die Anwendbarkeit dieser Erfindung nach unserer Vorstellung nicht nur auf diejenigen Spezies beschränkt, die gegenwärtig geeignete Substrate akkumulieren.

**[0056]** Wie oben erwähnt wird eine erfindungsgemäße Pflanzen-kappa-Hydroxylase eine Aktivität gegenüber verschiedenen Fettsäuresubstraten zeigen. Während der Biosynthese von Fetten in einer Pflanzenzelle sind die Fettsäuren üblicherweise kovalent an Acyl-Trägerproteine (ACP), Coenzym A (CoA) oder verschiedene zelluläre Lipide gebunden. Pflanzen-kappa-Hydroxylasen, die eine bevorzugte Aktivität gegenüber Lipid-gebundenen Acylsubstraten aufweisen, sind besonders bevorzugt, weil sie wahrscheinlich eng mit dem normalen Weg der Synthese von Speicherlipiden in unreifen Embryos assoziiert sind. Eine Aktivität gegenüber Acyl-CoA-Substraten und anderen synthetischen Substraten wird jedoch beispielsweise vorliegend ebenfalls vorgeschlagen.

**[0057]** Andere Pflanzen-kappa-Hydroxylasen sind ausgehend von den spezifischen, beispielhaft angeführten Sequenzen, die vorliegend bereitgestellt werden, erhältlich. Des Weiteren wird es ersichtlich sein, dass man natürliche und synthetische Pflanzen-kappa-Hydroxylasen, einschließlich modifizierter Aminosäuresequenzen und Startmaterialien, für das synthetische Protein-Modeling ausgehend von den beispielhaft angeführten Pflanzen-kappa-Hydroxylasen und den Pflanzen-kappa-Hydroxylasen, die durch Verwendung solcher beispielhaft angeführten Sequenzen erhalten werden, erhalten kann. Modifizierte Aminosäuresequenzen umfassen Sequenzen die mutiert, trunziert, vergrößert usw. wurden, wobei solche Sequenzen partiell oder vollständig synthetisiert sein können. Sequenzen, die tatsächlich aus Pflanzen-Präparationen gereinigt werden, oder die mit diesen identisch sind oder für identische Proteine kodieren, werden unabhängig von dem verwendeten Verfahren zum Erhalt des Proteins oder der Sequenz gleichermaßen als natürlich erhalten angesehen.

**[0058]** Der Fachmann wird somit problemlos erkennen, dass Antikörperpräparation, Nukleinsäure-Sonden (DNA oder RNA) u.ä. hergestellt und verwendet werden können, um "homologe" oder "verwandte" kappa-Hydroxylasen aus einer Vielzahl pflanzlicher Bezugsquellen durchzumustern (Screening) und zu gewinnen. Üblicherweise werden Nukleinsäure-Sonden markiert, um die Detektion zu erlauben, vorzugsweise mittels Radioaktivität, obwohl Enzyme oder andere Verfahren ebenfalls verwendet werden können. Für immunologische Screening-Verfahren werden entweder monoklonale oder polyklonale Antikörper-Präparationen verwendet. Polyklonale Antikörper sind üblicherweise bei der Isolierung von Genen nützlicher, obwohl sie weniger spezifisch sind. Bei der Detektion wird der Antikörper unter Verwendung von Radioaktivität oder mit einem beliebigen aus einer Vielzahl von Systemen aus sekundärem Antikörper/Enzymkonjugat markiert, die kommerziell verfügbar sind.

**[0059]** Homologe Sequenzen werden gefunden, wenn Sequenzidentität vorliegt, und sie können durch Vergleich der Sequenzinformation (Nukleinsäure oder Aminosäure) oder durch Hybridisierungsreaktionen zwischen einer bekannten kappa-Hydroxylase und einer Kandidaten-Bezugsquelle bestimmt werden. Konservative Austausch, wie Glu/Asp, Val/Ile, Ser/Thr, Arg/Lys und Gln/Asn können ebenfalls bei Bestimmung der Sequenzhomologie berücksichtigt werden. Üblicherweise kann eine längere Nukleinsäuresequenz eine geringe Sequenzidentität von nur 50 bis 60 %, und stärker bevorzugt eine Sequenzidentität von mindestens etwa 70 %, zwischen der Zielsequenz und der gegebenen Pflanzen-kappa-Hydroxylase von Interesse aufweisen (wobei jegliche Deletionen, die vorhanden sein können, nicht eingeschlossen sind) und dennoch als verwandt gelten. Aminosäuresequenzen werden bei einer Sequenzidentität von nur 25 % zwischen zwei vollständig reifen Proteinen als homolog angesehen (für einen allgemeinen Überblick siehe Doolittle, R.F., OF URFS and ORFS, University Science Books, CA, 1986).

**[0060]** Eine genomische oder eine andere geeignete Bibliothek, die ausgehend von einer Kandidatenpflanzen-Bezugsquelle von Interesse hergestellt worden ist, kann mit konservierten Sequenzen der Pflanzen-kappa-Hydroxylase als Sonde untersucht werden, um homolog verwandte Sequenzen zu identifizieren. Die Verwendung einer gesamten cDNA oder einer anderen Sequenz ist möglich, wenn kürzere Sonden-Sequenzen nicht identifiziert wurden. Positive Klone werden anschließend durch Restriktionsenzymverdau und/oder Sequenzierung analysiert. Wenn eine genomische Bibliothek verwendet wird, können eine oder mehrere Sequenzen identifiziert werden, wobei sowohl die kodierende Region als auch die transkriptionalen regulatorischen Elemente des kappa-Hydroxylase-Gens aus einer solchen Pflanzen-Bezugsquelle bereitgestellt werden. Sonden können auch beträchtlich kürzer sein als die gesamte Sequenz. Beispielsweise können Oligonukleotide verwendet werden, wobei diese mindestens etwa 10, vorzugsweise mindestens etwa 15, stärker bevorzugt

mindestens 20 Nukleotide lang sein sollten. Wenn Regionen kürzerer Länge für den Vergleich verwendet werden, ist ein höherer Grad von Identität erforderlich als bei längeren Sequenzen. Kürzere Sonden sind oftmals insbesondere nützlich bei einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR), insbesondere wenn hochkonservierte Sequenzen identifiziert werden können (siehe Gould et al., 1989 für Beispiele der Verwendung einer PCR zur Isolierung von homologen Genen aus taxonomisch verschiedenen Spezies).

**[0061]** Wenn längere Nukleinsäurefragmente als Sonden eingesetzt werden (> 100 bp), insbesondere bei Verwendung von vollständigen oder großen cDNA-Sequenzen, würde man ein Screening bei geringer Stringenz durchführen (beispielsweise bei 40 bis 50°C unter der Schmelztemperatur der Sonde), um ein Signal von der Zielprobe zu erhalten, welche eine Abweichung von 20 bis 50 % aufweist, d.h. homologe Sequenzen (Beltz et al., 1983).

**[0062]** Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird eine Pflanzen-kappa-Hydroxylase gemäß der vorliegenden Erfindung insgesamt mindestens 60 % Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit mit der beispielhaft angeführten Pflanzen-kappa-Hydroxylase aufweisen. Insbesondere werden kappa-Hydroxylasen bevorzugt, die von einer Aminosäure- oder Nukleinsäuresequenz aus Rizinus oder Lesquerella erhältlich sind. Die Pflanzen-kappa-Hydroxylasen können eine bevorzugte Aktivität gegenüber längererkettigen oder kürzererkettigen Fettsäuresubstraten aufweisen. Pflanzen-Fettsäure-Hydroxylasen, die eine Oleat-12-Hydroxylase-Aktivität und eine Eicosenoat-14-Hydroxylase-Aktivität aufweisen, werden beide aufgrund eines in vitro-Belegs (Howling et al., 1972) und aufgrund des vorliegend erbrachten Belegs, dass die Rizinus-kappa-Hydroxylase auf beide Substrate wirkt, als homolog verwandte Proteine angesehen. Die hydroxylierten Fettsäuren können weiteren enzymatischen Modifikationen durch andere Enzyme unterworfen werden, die normalerweise vorhanden sind oder durch biotechnologische Verfahren eingebracht werden. So wird beispielsweise angenommen, dass 14-Hydroxy-11,17-eicosadiensäure, die in einigen Lesquerella-Spezies vorhanden ist (Smith, 1985), durch Desaturierung von 14-Hydroxy-11-eicosensäure hergestellt wird.

**[0063]** Es können nicht nur Gen-Klone und Materialien, die sich von diesen ableiten, zur Identifizierung von homologen Pflanzen-Fettsäure-Hydroxylasen verwendet werden, sondern die resultierenden Sequenzen, die von diesen erhalten werden, können auch ein weiteres Verfahren zum Erhalt von Pflanzen-Fettsäure-Hydroxylasen aus anderen pflanzlichen Bezugsquellen bereitstellen. Die PCR könnte eine besonders nützliche Methode sein, um ausgehend von den vorliegend bereitgestellten Sequenzdaten verwandte Pflanzen-Fettsäure-Hydroxylasen zu erhalten. Der Fachmann wird in der Lage sein, Oligonukleotid-Sonden zu erstellen, die auf Sequenzvergleichen oder Regionen basieren, die eine eine hochkonservierte Sequenz aufweisen. Von besonderem Interesse sind Polymerase-Kettenreaktions-Primer, die auf den konservierten Aminosäuresequenz-Regionen zwischen der Rizinus-kappa-Hydroxylase und der *L. fendleri*-Hydroxylase (SEQ ID NO: 4) basieren. Details zum Erstellen von Sonden sowie zu Verfahren für eine PCR-Reaktion unter Verwendung dieser Sonden werden in den Beispielen näher beschrieben.

**[0064]** Es sollte ferner angemerkt werden, dass die Fettsäure-Hydroxylasen von einer Vielzahl von Bezugsquellen dazu verwendet werden können, Fettsäure-Hydroxylierungs-Ereignisse in einer großen Vielzahl von Pflanzen und in vivo-Applikationen zu untersuchen. Da alle Pflanzen Fettsäuren über einen gemeinsamen metabolischen Weg synthetisieren, kann die Untersuchung und/oder Anwendung einer Pflanzen-Fettsäure-Hydroxylase mit einem heterologen Pflanzen-Wirt problemlos in einer Vielzahl von Spezies erreicht werden.

**[0065]** Sobald die Nukleinsäuresequenz erhalten wurde, ist die Transkription oder die Transkription und Translation (Expression) der Pflanzen-Fettsäure-Hydroxylasen in einer Wirtszelle angestrebt, um eine einfache Bezugsquelle für das Enzym herzustellen und/oder die Zusammensetzung der Fettsäuren zu modifizieren, die in dieser in Form von freien Fettsäuren, Estern (insbesondere mit Glycerol-Lipiden verestert oder als Bestandteile von Wachs-Estern), Estoliden oder Ethern vorgefunden werden. Andere nützliche Anwendungen können gefunden werden, wenn die Wirtszelle eine Pflanzen-Wirtszelle ist, in vitro und in vivo.

**[0066]** Beispielsweise kann durch Erhöhen der Menge an kappa-Hydroxylase, die der Pflanze zugänglich ist, ein erhöhter Prozentsatz von Rizinoleat oder Lesqueroleat (14-Hydroxy-11-eicosensäure) bereitgestellt werden.

#### Kappa-Hydroxylase

**[0067]** Die vorliegende Erfindung zeigt einen Mechanismus der Biosynthese von Rizinolsäure in Pflanzen; es wird nämlich gezeigt, dass eine spezifische Pflanzen-kappa-Hydroxylase mit bevorzugter Aktivität gegenüber Fettsäuresubstraten zumindest in einigen Pflanzen-Spezies an der Akkumulierung von hydroxylierten Fettsäu-

ren beteiligt ist. Die Verwendung der Begriffe Rizinoleat oder Rizinolsäure (oder Lesqueroleat oder Lesquerolsäure, Densipoleat usw.) soll die freien Säuren, die ACP- und CoA-Ester, die Salze dieser Säuren, die Glycerol-Lipidester (insbesondere die Triacylglycerolester), die Wachs-Ester, die Estoliden und die Etherderivate dieser Säuren umfassen.

**[0068]** Die Feststellung, dass Pflanzen-Fettsäure-Hydroxylasen an der in vivo-Produktion von hydroxylierten Fettsäuren aktiv beteiligt sind, verweist auf mehrere Möglichkeiten hinsichtlich der Bezugsquellen für das Pflanzenenzym. Tatsächlich werden hydroxylierte Fettsäuren in einigen natürlichen Pflanzen-Spezies im Überschuss vorgefunden. Beispielsweise kommen drei Hydroxy-Fettsäuren, die mit Rizinoleat verwandt sind, in großen Mengen in Samenölen verschiedener Lesquerella-Spezies vor. Besonders interessant ist die Lesquerolsäure, ein Homolog zu Rizinoleat von 20 Kohlenstoffatomen mit zwei zusätzlichen Kohlenstoffatomen am Carboxyl-Ende der Kette (Smith, 1985). Andere natürliche Pflanzen-Bezugsquellen für hydroxylierte Fettsäuren umfassen (sind jedoch nicht beschränkt auf) Samen der Gattung Linum, Samen von Wrightia-Spezies, Lycopodium-Spezies, Strophanthus-Spezies, Convolvulaces-Spezies, Calendula-Spezies und zahlreichen anderen (van der Loo et al., 1993).

**[0069]** Pflanzen mit signifikantem Vorhandensein von Rizinoleat oder Lesqueroleat oder desaturierten anderen oder modifizierten Derivaten dieser Fettsäuren sind bevorzugte Kandidaten, um natürlich abgeleitete kappa-Hydroxylasen zu erhalten. Beispielsweise enthält *Lesquerella densipila* eine zweifach ungesättigte Fettsäure mit 18 Kohlenstoffatomen mit einer Hydroxyl-Gruppe (van de Loo et al., 1993), von der gemäß der Theorie, auf der diese Erfindung basiert, angenommen wird, dass sie von einem Enzym produziert wird, das mit der Rizinus-kappa-Hydroxylase eng verwandt ist. Darüber hinaus kann ein Vergleich zwischen kappa-Hydroxylasen und zwischen Pflanzen-Fettsäure-Hydroxylasen, die Hydroxyl-Gruppen an anderen Positionen als dem 12-Kohlenstoffatom des Oleats oder dem 14-Kohlenstoffatom des Lesqueroleats einbringen, oder Hydroxyl-Gruppen bei anderen Substraten als Ölsäure und Icosensäure einbringen, Einblicke für das Protein-Modeling und für andere Modifikationen zur Erzeugung synthetischer Hydroxylasen geben, wie oben diskutiert wird. Beispielsweise streben wir an, auf Basis der Informationen, welche aus den strukturellen Vergleichen der  $\Delta 12$ -Desaturasen und der kappa-Hydroxylase erhalten werden, genetische Modifikationen in den Struktur-Genen der  $\Delta 12$ -Desaturasen vorzunehmen, die diese Desaturasen zu kappa-Hydroxylasen umwandeln. Wir streben ferner an, Veränderungen in  $\Delta 15$ -Hydroxylasen vorzunehmen, die diese zu Hydroxylasen umwandeln, welche eine Substrat-Spezifität aufweisen, die mit der der Desaturasen vergleichbar ist (z. B. Konversion von  $18:2^{\Delta 9,12}$  zu  $15OH-18:2^{\Delta 9,12}$ ). Da der Unterschied zwischen einer Hydroxylase und einer Desaturase die Anordnung eines Protons betrifft, denken wir, dass diese Veränderung durch systematische Veränderung der geladenen Gruppen im Bereich nahe des aktiven Zentrums des Enzyms bewirkt werden kann.

**[0070]** Von besonderem Interesse sind Fettsäure-Hydroxylasen, die eine Aktivität gegenüber anderen Fettsäure-Substraten als Oleat zeigen oder die Hydroxyl-Gruppe an einer anderen Stelle als dem C12-Kohlenstoffatom einbringen. Wie oben beschrieben ist, können auch andere Pflanzen-Bezugsquellen Bezugsquellen für diese Enzyme bereitstellen, z.B. durch die Verwendung von Proteinreinigung, Nukleinsäure-Sonden, Antikörper-Präparationen, Protein-Modeling oder Sequenzvergleichen. Von besonderem Interesse sind die jeweiligen Aminosäure- und Nukleinsäuresequenzen, die solchen Pflanzen-Fettsäure-Hydroxylasen entsprechen. Wie ebenfalls zuvor beschrieben wurde, können – sobald eine Nukleinsäuresequenz für eine gegebene Pflanzen-Hydroxylase erhalten wird – weitere pflanzliche Sequenzen verglichen und/oder mit Sonden untersucht werden, um zu dieser Nukleinsäuresequenz homolog verwandte DNA-Sequenzen zu erhalten usw.

#### Verwendungen in Gentechnik-Anwendungen

**[0071]** Wie im Stand der Technik hinreichend bekannt ist, kann ein für eine Pflanzen-kappa-Hydroxylase kodierender cDNA-Klon, sobald er erhalten wurde, dazu verwendet werden, die entsprechenden genomischen Nukleinsäuresequenzen zu diesem zu erhalten.

**[0072]** Die Nukleinsäuresequenzen, die für die Pflanzen-kappa-Hydroxylasen kodieren, können in verschiedenen Konstrukten verwendet werden, z.B. als Sonden, um weitere Sequenzen von derselben oder von anderen Spezies zu erhalten. Alternativ dazu können die Sequenzen in Verbindung mit geeigneten regulatorischen Sequenzen verwendet werden, um die Mengen der jeweiligen Hydroxylase von Interesse in einer Wirtszelle für die Produktion von hydroxylierten Fettsäuren zu erhöhen, oder zur Untersuchung des Enzyms in vitro oder in vivo, oder um die Mengen der jeweiligen Hydroxylase von Interesse bei einigen Anwendungen zu verringern oder zu erhöhen, in denen die Wirtszelle eine Pflanzen-Einheit ist, einschließlich Pflanzenzellen, Pflanzenteilen (einschließlich jedoch nicht beschränkt auf Samen, Schnitte oder Gewebe) und Pflanzen.

**[0073]** Eine Nukleinsäuresequenz, die für eine Pflanzen-kappa-Hydroxylase gemäß der vorliegenden Erfindung kodiert, kann eine genomische, eine cDNA- oder eine mRNA-Sequenz umfassen. Mit "kodierend" ist gemeint, dass die Sequenz einer bestimmten Aminosäuresequenz entspricht, entweder in einer Sense-Orientierung oder in einer Antisense-Orientierung. Mit "rekombinant" ist gemeint, dass die Sequenz eine Modifikation enthält, die gentechnisch durch Manipulation mittels Mutagenese, Restriktionsenzyme und Ähnliches erzeugt wurde. Eine cDNA-Sequenz kann für Prä-Prozessierungssequenzen, wie beispielsweise Transit- oder Signalpeptid-Sequenzen, kodieren oder auch nicht. Transit- oder Signalpeptid-Sequenzen ermöglichen die Bereitstellung des Proteins an ein gegebenes Organell und werden oftmals bei Eintritt in das Organell von dem Polypeptid abgespalten, wobei die "reife" Sequenz freigesetzt wird. Die Verwendung der Vorläufer-DNA-Sequenz ist bei pflanzlichen Zell-Expressions-Kassetten bevorzugt.

**[0074]** Ferner kann wie oben erwähnt die vollständige genomische Sequenz der Pflanzen-kappa-Hydroxylase durch Screening einer genomischen Bibliothek mit einer Sonde, wie beispielsweise einer cDNA-Sonde, und Isolierung derjenigen Sequenzen, die die Expression in Samen-Gewebe regulieren, erhalten werden. Auf diese Weise können Transkriptions- und Translations-Initiationsregionen, Introns, und/oder Transkript-Terminationsregionen der Pflanzen-kappa-Hydroxylase für die Verwendung in einer Vielzahl von DNA-Konstrukten erhalten werden, mit oder ohne kappa-Hydroxylase-Struktur-Gen. Somit können Nukleinsäuresequenzen, die der erfindungsgemäßen Pflanzen-kappa-Hydroxylase entsprechen, auch Signalsequenzen bereitstellen, die für den direkten Transport in ein Organell nützlich sind, 5'-stromaufwärts gelegene nicht-kodierende regulatorische Regionen (Promotoren) mit nützlichen Gewebe- und Timing-Eigenschaften, 3'-stromabwärts gelegene nicht-kodierende regulatorische Regionen, welche als transkriptionale und translationale regulatorische Regionen nützlich sind, und sie können Einblick in andere Eigenschaften des Gens vermitteln.

**[0075]** Sobald die gewünschte Nukleinsäuresequenz der Pflanzen-kappa-Hydroxylase erhalten wird, kann sie auf vielfältige Weise manipuliert werden. Wenn die Sequenz nicht-kodierende flankierende Regionen umfaßt, können die flankierenden Regionen einer Resektion, einer Mutagenese usw. unterworfen werden. Somit können Transitionen, Transversionen, Deletionen und Insertionen bei der natürlich vorkommenden Sequenz durchgeführt werden. Darüber hinaus kann die gesamte Sequenz oder ein Teil der Sequenz synthetisiert werden. Ein oder mehrere Kodons im Struktur-Gen können modifiziert werden, um eine modifizierte Aminosäuresequenz bereitzustellen, oder es können ein oder mehrere Kodon-Mutationen eingebracht werden, um für geeignete Restriktionsschnittstellen zu sorgen, oder aus anderen Gründen, die bei der Konstruktion oder Expression eine Rolle spielen. Das Struktur-Gen kann ferner durch Verwendung synthetischer Adapter oder durch Verwendung von Verbindungsmolekülen zur Einbringung einer oder mehrerer geeigneter Restriktionsschnittstellen o.ä. modifiziert werden.

**[0076]** Die Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenz, die für eine Pflanzen-kappa-Hydroxylase gemäß der vorliegenden Erfindung kodiert, kann auf vielfältige Weise mit anderen nicht-nativen (oder "heterologen") Sequenzen kombiniert werden. Mit "heterologen" Sequenzen ist jede beliebige Sequenz gemeint, die natürlicherweise nicht in Verbindung mit der Pflanzen-kappa-Hydroxylase vorgefunden wird, einschließlich z.B. eine Kombination von Nukleinsäuresequenzen aus derselben Pflanze, die natürlicherweise nicht miteinander verbunden vorgefunden werden.

**[0077]** Die DNA-Sequenz, die für eine Pflanzen-kappa-Hydroxylase gemäß der vorliegenden Erfindung kodiert, kann in Verbindung mit allen oder einem Teil der Gen-Sequenzen verwendet werden, die normalerweise mit der kappa-Hydroxylase assoziiert sind. Eine DNA-Sequenz, die für eine kappa-Hydroxylase kodiert, wird in ihren Einzelteilen in ein DNA-Konstrukt kombiniert, das in 5'-3'-Richtung der Transkription eine Transkriptions-Initiations-Kontrollregion umfaßt, die in der Lage ist, die Transkription und Translation in einer Wirtszelle zu fördern, die DNA-Sequenz, die für die Pflanzen-kappa-Hydroxylase kodiert, sowie eine die Transkription oder Translation terminierende Region.

**[0078]** Potentielle Wirtszellen umfassen prokaryotische und eukaryotische Zellen. Eine Wirtszelle kann – abhängig von der beabsichtigten Verwendung – einzellig sein oder in einem vielzellig differenzierten oder undifferenzierten Organismus vorkommen. Zellen gemäß dieser Erfindung können dadurch unterschieden werden, dass sie eine Pflanzen-kappa-Hydroxylase aufweisen, die in Bezug auf die Wildtypzelle, in der diese vorliegt, fremd ist, beispielsweise, indem sie ein rekombinantes Nukleinsäurekonstrukt aufweist, das für eine Pflanzen-kappa-Hydroxylase kodiert.

**[0079]** Abhängig vom Wirt werden die regulatorischen Regionen variieren, wobei Regionen aus viralen Genen, aus Plasmid-Genen oder aus chromosomalen Genen oder Ähnlichen eingeschlossen sind. Für die Expression in prokaryotischen oder eukaryotischen Mikroorganismen, insbesondere in einzelligen Wirten, kann

eine große Vielzahl von konstitutiven oder regulierbaren Promotoren eingesetzt werden. Die Expression in einem Mikroorganismus kann eine einfache Bezugsquelle für das Pflanzen-Enzym bereitstellen. Unter den beschriebenen Transkriptions-Initiations-Regionen sind Regionen aus bakteriellen Wirten und aus Hefe-Wirten, wie beispielsweise *E. coli*, *B. subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, wobei Gene wie  $\beta$ -Galaktosidase, T7-Polymerase, Tryptophan E und Ähnliche eingeschlossen sind.

**[0080]** Die Konstrukte werden meist regulatorische Regionen umfassen, die in Pflanzen funktionstüchtig sind, was für die modifizierte Produktion von Pflanzen-kappa-Hydroxylase sorgt und zu einer Modifikation der Fettsäurezusammensetzung führt. Der offene Leserahmen, der für die Pflanzen-kappa-Hydroxylase oder ein funktionstüchtiges Fragment derselben kodiert, wird an seinem 5'-Ende mit einer regulatorischen Transkriptions-Initiations-Region, wie z.B. der Wildtypsequenz, die natürlicherweise 5'-stromaufwärts vom kappa-Hydroxylase-Struktur-Gen vorkommt, zusammengefügt. Zahlreiche andere Transkriptions-Initiations-Regionen sind verfügbar, die für eine große Vielzahl von konstitutiven oder regulierbaren (z.B. induzierbaren) Funktionen der Transkription des Struktur-Gens sorgen. Unter den Transkriptions-Initiations-Regionen, die für Pflanzen verwendet werden, sind solche Regionen, die beispielsweise mit den Struktur-Genen der Nopalins-Synthase und der Mannopin-Synthase assoziiert sind, oder mit Napin, Sojabohnen- $\beta$ -conglycinin, Oleosin, dem 12S-Speicherprotein, den 35S-Promotoren des Blumenkohl-Mosaikvirus und Ähnlichen. Die Transkription/Translation-Initiations-Regionen, die solchen Struktur-Genen entsprechen, werden unmittelbar 5'-stromaufwärts vom jeweiligen Startkodon gefunden. In Ausführungsformen, in denen die Expression des kappa-Hydroxylase-Proteins in einem Pflanzenwirt erwünscht ist, wird die Verwendung des gesamten oder eines Teils des vollständigen Pflanzen-kappa-Hydroxylase-Gens angestrebt; es können dementsprechend alle oder ein Teil der 5'-stromaufwärts gelegenen nicht-kodierenden Regionen (Promotor) gemeinsam mit der Sequenz des Struktur-Gens und den 3'-stromabwärts gelegenen nicht-kodierenden Regionen verwendet werden. Wenn ein anderer Promotor erwünscht ist (wie beispielsweise ein Promotor der in Bezug auf den Pflanzen-Wirt von Interesse nativ ist, oder ein modifizierter Promotor, d.h. mit Transkriptions-Initiations-Regionen, die von einer Gen-Bezugsquelle stammen, und Translations-Initiations-Regionen, die von einer anderen Gen-Bezugsquelle stammen, einschließlich der Sequenz, die für die Pflanzen-kappa-Hydroxylase von Interesse kodiert, oder verstärkende Promotoren, wie die Double-35S-CaMV-Promotoren, können die Sequenzen unter Verwendung von Standardverfahren zusammengefügt werden.

**[0081]** Bei Anwendungen, in denen die 5'-stromaufwärts gelegenen nicht-kodierenden Regionen von anderen während der Samenreife regulierten Genen erhalten werden, sind vorzugsweise solche erwünscht, die in Embryo-Gewebe von Pflanzen exprimiert werden, wie die Transkriptions-Initiations-Kontrollregionen des Napin-Gens aus *B. napus* oder des 12S-Speicherproteins von *Arabidopsis*, oder des  $\beta$ -conglycinins aus Sojabohnen (Bray et al., 1987), oder der kappa-Hydroxylase-Promotor aus *L. fendleri*, der vorliegend beschrieben wird. Transkriptions-Initiations-Regionen, die vorzugsweise in Samen-Gewebe exprimiert werden, d.h. die in anderen Pflanzen-Teilen nicht nachgewiesen werden können, werden für Fettsäuremodifikationen als wünschenswert erachtet, um alle störenden oder nachteiligen Auswirkungen auf das Gen-Produkt zu minimieren.

**[0082]** Regulatorische Transkript-Terminations-Regionen können ebenfalls in den erfindungsgemäßen DNA-Konstrukten vorgesehen werden. Transkript-Terminations-Regionen können durch die DNA-Sequenz bereitgestellt werden, die für die Pflanzen-kappa-Hydroxylase kodiert, oder es kann eine vorteilhafte Transkriptions-Terminations-Region von einer anderen Gen-Bezugsquelle abgeleitet werden, beispielsweise von der Transkript-Terminations-Region, die natürlicherweise mit der Transkript-Initiations-Region assoziiert ist. Wenn die Transkript-Terminations-Region von einer anderen Gen-Bezugsquelle stammt, wird sie mindestens etwa 0,5 kb, vorzugsweise etwa 1 bis 3 kb, der Sequenz 3' vom Struktur-Gen enthalten, von dem die Terminations-Region abgeleitet ist.

**[0083]** Pflanzen-Expressions- oder Transkriptions-Konstrukte mit einer Pflanzen-kappa-Hydroxylase als DNA-Sequenz von Interesse für die gesteigerte oder verringerte Expression derselben können mit einer großen Vielzahl von pflanzlichen Lebensformen verwendet werden, insbesondere mit pflanzlichen Lebensformen, die bei der Herstellung von pflanzlichen Ölen für Nahrungszwecke und industrielle Anwendungen beteiligt sind. Am stärksten bevorzugt sind gemäßigte Ölsamen-Nutzpflanzen. Pflanzen von Interesse umfassen (sind jedoch nicht beschränkt auf) Raps (Canola und Sorten mit hohem Erucasäure-Gehalt), Crambe, Brassica juncea, Brassica nigra, Sumpflblume (meadowfom), Flachs, Sonnenblume, Distel, Baumwolle, Cuphea, Sojabohne, Erdnuss, Kokosnuss und Ölpalmen und Mais. Ein wichtiges Kriterium bei der Auswahl geeigneter Pflanzen für die Einbringung einer kappa-Hydroxylase ist das Vorhandensein eines geeigneten Substrats für die Hydroxylase in der Wirtspflanze. Daher wird beispielsweise die Produktion von Rizinolsäure am besten in Pflanzen erreicht, die normalerweise hohe Mengen Ölsäure in den Samen-Lipiden aufweisen. Die Produktion von Lesquerolsäure wird am besten in Pflanzen erreicht, die hohe Mengen Icosensäure in den Samen-Lipiden

aufweisen.

**[0084]** Abhängig von den Verfahren zur Einbringung der rekombinanten Konstrukte in die Wirtszelle können weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Es ist wichtig, dass die Erfindung bei dikotylen und monokotylen Spezies gleichermaßen angewendet werden kann und problemlos auf neue und/oder verbesserte Transformations- und Regulationsverfahren anwendbar ist. Das Verfahren der Transformation ist für die vorliegende Erfindung nicht entscheidend; verschiedene Verfahren der Transformation von Pflanzen sind gegenwärtig verfügbar. Sofern neuere Verfahren zur Transformation von Nutzpflanzen verfügbar sind, können diese direkt im vorliegenden Rahmen verwendet werden. Beispielsweise können zahlreiche Pflanzen-Spezies, die von Natur aus für eine Agrobacterium-Infektion empfänglich sind, erfolgreich durch Verfahren der Agrobacterium-vermittelten Transformation unter Verwendung von binären oder dreiteiligen Vektoren transformiert werden. Zusätzliche Verfahren von Mikroinjektion, DNA-Partikelbombardment und Elektroporation sind entwickelt worden, die die Transformation verschiedener monokotylen und dikotylen Pflanzen-Spezies erlauben.

**[0085]** Bei der Entwicklung der DNA-Konstrukte werden die verschiedenen Bestandteile des Konstruktes oder Fragmente desselben in einen geeigneten Klonierungsvektor inseriert, der in der Lage ist, sich in einem bakteriellen Wirt zu replizieren, z.B. in *E. coli*. Es existieren zahlreiche Vektoren, die in der Literatur beschrieben wurden. Nach jeder Klonierung kann das Plasmid isoliert und weiteren Manipulationen unterzogen werden, wie beispielsweise Restriktion, Insertion von neuen Fragmenten, Ligation, Deletion, Insertion, Resektion etc., sodass die Bestandteile der gewünschten Sequenz zurechtgeschnitten werden. Sobald das Konstrukt vollständig ist, kann es gemäß der Art der Wirtszellen-Transformation für die weitere Manipulation in einen geeigneten Vektor eingebracht werden.

**[0086]** Normalerweise wird das DNA-Konstrukt ein Struktur-Gen mit den notwendigen regulatorischen Regionen für die Expression in einem Wirt und die Selektion von transformierten Zellen umfassen. Das Gen kann für eine Resistenz gegen ein cytotoxisches Mittel, z.B. ein Antibiotikum, ein Schwermetall, ein Toxin usw. sorgen, für eine Komplementierung, die für eine Prototrophie in einem auxotrophen Wirt sorgt, für virale Immunität und Ähnliches. Abhängig von der Anzahl der verschiedenen Wirts-Spezies, in die das Expressionskonstrukt oder Bestandteile desselben eingebracht wird, können ein oder mehrere Marker verwendet werden, wobei verschiedene Selektionbedingungen bei den verschiedenen Wirten angewendet werden.

**[0087]** Es wird angemerkt, dass die Degeneration des DNA-Codes dafür sorgt, dass einige Kodon-Substitutionen bei DNA-Sequenzen zulässig sind, ohne irgendeine entsprechende Modifikation bei der Aminosäuresequenz zu verursachen.

**[0088]** Wie oben erwähnt, ist die Art, auf die das DNA-Konstrukt in die Pflanzenzelle eingebracht wird, für die vorliegende Erfindung nicht entscheidend. Jedes beliebige Verfahren, das für eine effiziente Transformation sorgt, kann verwendet werden. Verschiedene Verfahren der Transformation von Pflanzenzellen umfassen die Verwendung von Ti- oder Ri-Plasmiden, Mikroinjektion, Elektroporation, Infiltration, Imbibition, DNA-Partikelbombardment, Liposomenfusion, DNA-Bombardment oder Ähnliches. In vielen Fällen wird es erwünscht sein, dass das Konstrukt auf einer oder auf beiden Seiten der T-DNA eingegrenzt ist; es wird besonders erwünscht sein, dass die linke und die rechte Grenze vorhanden sind, insbesondere die rechte Grenze. Dies ist besonders nützlich, wenn das Konstrukt *A. tumefaciens* oder *A. rhizogenes* als Art der Transformation verwendet, obgleich die T-DNA-Grenzen auch bei anderen Arten der Transformation Anwendung finden können.

**[0089]** Wenn Agrobacterium für die Transformation der Pflanzenzellen verwendet wird, kann ein Vektor verwendet werden, der zum Zwecke der homologen Kombination mit der T-DNA oder dem Ti- oder Ri-Plasmid, die in dem Agrobacterium-Wirt vorhanden sind, in den Agrobacterium-Wirt eingebracht wird. Das Ti- oder Ri-Plasmid, welches die T-DNA für die Rekombination umfasst, kann „bewaffnet“ (armed) sein (fähig, die Gallen-Bildung hervorzurufen) oder „unbewaffnet“ (disarmed) sein (unfähig, Gallen hervorzurufen), wobei letzteres erlaubt ist, solange die vir-Gene in dem transformierten Agrobacterium-Wirt vorhanden sind. Das „bewaffnete“ Plasmid kann zu einer Mischung von normalen Pflanzenzellen und Gallen führen.

**[0090]** In einigen Fällen, in denen Agrobacterium als Vehikel zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet wird, wird das von der (den) T-DNA-Grenze(n) eingefasste Expressionskonstrukt in einen Vektor mit breitem Wirtsspektrum inseriert, wobei Vektoren mit breitem Wirtsspektrum in der Literatur beschrieben sind. Oftmals wird pRK2 oder Derivate desselben verwendet. Siehe beispielsweise Ditta et al. (1980). Umfasst vom Expressionskonstrukt und der T-DNA werden ein oder mehrere Marker sein, die die Selektion von transformiertem Agrobacterium und transformierten Pflanzenzellen erlauben. Mehrere Marker sind für die Verwendung in Pflanzenzellen entwickelt worden, wie z.B. die Resistenz gegen Kanamycin, das Aminoglykosid G418, Hygro-

mycin und Ähnliche. Abhängig vom jeweiligen Wirt und der Art der Konstruktion werden verschiedene Marker bevorzugt werden.

**[0091]** Bei der Transformation von Pflanzenzellen unter Verwendung von *Agrobacterium* können Explantate kombiniert und mit dem transformierten *Agrobacterium* für eine ausreichende Transformationsdauer inkubiert werden. Die Bakterien werden getötet und die Pflanzenzellen werden in einem geeigneten selektiven Medium kultiviert. Sobald sich der Callus gebildet hat, kann die Sprossbildung durch Verwendung geeigneter Pflanzenhormone nach bekannten Verfahren unterstützt werden, und die Sprösslinge können zur Regeneration der Pflanzen auf Medium zur Wurzelbildung übertragen werden. Die Pflanzen können anschließend angezchtet werden, um Samen zu bilden, und die Samen können verwendet werden, um repetitive Generationen zu etablieren, und um pflanzliche Öle zu isolieren.

**[0092]** Die nunmehr allgemein beschriebene Erfindung wird leichter durch Verweis auf die nachfolgenden Beispiele verständlich sein, wobei diese lediglich zum Zwecke der Illustration enthalten sind und die vorliegende Erfindung nicht beschränken sollen.

## BEISPIELE

**[0093]** In der nachfolgenden experimentellen Offenbarung werden alle Temperaturen in Grad Celsius (°) angegeben, Gewichte werden in Gramm (g), Milligramm (mg) oder Mikrogramm (µg) angegeben, Konzentrationen werden in molar (M), millimolar (mM) oder mikromolar (µM) angegeben, und alle Volumen werden in Litern (l), Mikrolitern (µl) oder Millilitern (ml) angegeben, sofern nicht auf anderes verwiesen wird.

### BEISPIEL 1 – HERSTELLUNG VON NEUEN HYDROXYLIERTEN FETTSÄUREN IN ARABIDOPSIS THALIANA

#### Übersicht

**[0094]** Die kappa-Hydroxylase, die durch das zuvor beschriebene *fah12*-Gen von *Rizinus* kodiert wird, wurde verwendet, um Rizinolsäure, Lesquerolsäure, Densipolsäure und Auricolsäure in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen herzustellen. Dieses Beispiel setzt das in der vorhergehenden Anmeldung gelehrt Beispiel 2 in die Praxis um.

#### Herstellung von transgenen Pflanzen

**[0095]** Eine Vielzahl von Verfahren ist entwickelt worden, um eine DNA-Sequenz von Interesse in das Genom eines Pflanzen-Wirts zu insertieren, um die Transkription und Translation der Sequenz zur Verursachung einer phänotypischen Veränderung zu erhalten. Die nachfolgenden Verfahren stellen lediglich eines von mehreren äquivalenten Mitteln zur Herstellung transgener Pflanzen und zum Bewirken der Expression des Hydroxylase-Gens dar.

**[0096]** *Arabidopsis*-Pflanzen wurden durch *Agrobacterium*-vermittelte Transformation transformiert, wobei die kappa-Hydroxylase durch das *fah12*-Gen von *Rizinus* auf dem binären Ti-Plasmid pB6 kodiert wurde. Dieses Plasmid wurde zuvor verwendet, um *Nicotiana tabacum* zum Zwecke der Herstellung von Rizinolsäure zu transformieren.

**[0097]** Material zum Animpfen des *Agrobacterium tumefaciens*-Stamms GV3101, der das binäre Ti-Plasmid pB6 enthielt, wurde auf L-Nährmedium-Platten ausplattiert, die 50 µg/ml Kanamycin enthielten, und für 2 Tage bei 30°C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden verwendet, um große Flüssigkeitskulturen (L-Nährmedium mit 50 mg/l Rifampicin, 110 mg/l Gentamycin und 200 mg/l Kanamycin) anzupflanzen, die für die Transformation von *Arabidopsis*-Pflanzen verwendet wurden.

**[0098]** Die *Arabidopsis*-Pflanzen wurden mittels der in planta-Transformationsmethode transformiert, wie sie im Wesentlichen von Bechtold et al., 1993) beschrieben wurde. Zellen von *A. tumefaciens* GV3101 (pB6) wurden durch Zentrifugation aus Flüssigkulturen geerntet, anschließend bei einer  $OD_{600} = 0,8$  in Infiltrationsmedium resuspendiert (Infiltrationsmedium war Murashige und Skoog Makro- und Mikronährstoffmedium (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), das 10 mg/l 6-Benzylaminopurin und 5 % Glucose enthielt). Gruppen von 12–15 Pflanzen wurden für 3 bis 4 Wochen bei natürlichem Licht bei einer durchschnittlichen täglichen Temperatur von ungefähr 25°C in Töpfen von 8,89 cm (3,5 Inch), die Erde enthielten, angezchtet. Die intakten Pflanzen wurden in die bakterielle Suspension eingetaucht und anschließend in einer Vakuumkammer eingebracht und

unter ein Vakuum von 600 mm gesetzt, das von einer Laborvakuumpumpe produziert wurde, bis die Gewebe einheitlich mit Wasser durchtränkt erschienen (ungefähr 10 Minuten). Die Pflanzen wurden bei 25°C für 4 Wochen bei kontinuierlichem Licht angezchtet (100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Bestrahlung im Bereich von 400 bis 700 nm). Die Samen, die von allen Pflanzen in einem Topf erhalten wurden, wurden als eigene Gruppe geerntet. Die Samen wurden durch sequentielle Behandlung für 2 Minuten mit Ethanol, gefolgt von 10 Minuten mit einer Mischung von Haushaltsbleiche (Chlorox), Wasser und Tween-80 (50 %, 50 %, 0,05 %) sterilisiert und anschließend gründlich mit sterilem Wasser gespült. Die Samen wurden in 100 ml Petrischalen in einer hohen Dichte (2000 bis 4000 pro Platte) auf Agar-verfestigtem Medium ausplattiert, das 1/2  $\times$  Murashige und Skoog-Salzmedium enthielt, mit B5-Vitaminen (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) angereichert war und 50 mg/l Kanamycin enthielt. Nach Inkubation für 48 Stunden bei 4°C zur Stimulation der Keimung wurden die Keimlinge für einen Zeitraum von 7 Tagen angezchtet, bis die Transformanten eindeutig als gesunde grüne Keimlinge gegen einen Hintergrund von chlorotischen, Kanamycin-sensitiven Keimlingen identifiziert werden konnten. Die Transformanten wurden für 2 Wochen auf Erde übertragen, bevor Blattgewebe für die DNA- und Lipid-Analyse benutzt werden konnte. Mehr als 20 Transformanten wurden erhalten.

**[0099]** Die DNA wurde aus jungen Blättern von Transformanten extrahiert, um das Vorhandensein eines intakten *fah12*-Gens zu verifizieren. Das Vorhandensein des Transgens in mehreren vermeintlichen transgenen Linien wurde unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifizierung des Inserts von pB6 verifiziert. Bei den verwendeten Primer handelte es sich um HF2 = GCTCTTTTGTGCGCTCATTC (SEQ ID NO: 12) und HR1 = CGGTACCAGAAAACGCCTTG (SEQ ID NO: 13), die erstellt wurden, um die Amplifikation eines 700 bp-Fragments zu erlauben. Ungefähr 100 ng genomische DNA wurden zu einer Lösung gegeben, die 25 pmol von jedem Primer enthielt, 1,5 U Taq-Polymerase (Boehringer Mannheim), 200  $\mu\text{M}$  dNTPs, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9), 0,1 % (v/v) Triton X-00, 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 3 % (v/v) Formamid, das Endvolumen betrug 50  $\mu\text{l}$ . Die Amplifikationsbedingungen waren: 4 min Denaturierungsschritt bei 94°C, gefolgt von 30 Zyklen bei 92°C für 1 min, 55°C für 1 min, 72°C für 2 min. Ein finaler Extensionsschritt bei 72°C für 5 min schloss das Programm ab. Die Transformanten konnten nach Sichtbarmachen eines charakteristischen amplifizierten Fragments von 1 kb auf einem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel in positiver Hinsicht identifiziert werden. Alle transgenen Linien, die getestet wurden, ergaben ein PCR-Produkt einer Größe, die mit dem erwarteten Genotyp übereinstimmte, was bestätigte, dass die Linien in der Tat transgen waren. Alle weiteren Experimente wurden mit drei repräsentativen transgenen Linien des Wildtyps durchgeführt, die als 1-3, 4D, 7-4 bezeichnet wurden, sowie mit einer Linie der *fad2*-Mutantenlinie JB12. Die transgene JB12-Linie wurde einbezogen, um zu testen, ob die erhöhte Akkumulierung von Ölsäure in dieser Mutante eine Auswirkung auf die Menge der Rizinolsäure hat, die in transgenen Pflanzen akkumuliert wird.

#### Analyse von transgenen Pflanzen

**[0100]** Blätter und Samen von *fah12*-transgenen Arabidopsis-Pflanzen wurden unter Verwendung der Gaschromatographie auf das Vorhandensein von hydroxylierten Fettsäuren analysiert. Die Lipide wurden aus 100–200 mg Blattgewebe oder aus 50 Samen extrahiert. Es wurden Fettsäuremethylester (FAMES) hergestellt, indem Gewebe in einem 13  $\times$  100 mm Glasbehälter mit Schraubverschluss, der mit einer mit Teflon ausgekleideten Kappe versehen war, in 1,5 ml 1,0 M methanolischem HCl (Supelco Co.) eingebracht und für 2 Stunden auf 80°C erhitzt wurde. Beim Abkühlen wurde 1 ml Petroleumether zugegeben, und die FAMES wurden entfernt, indem die Etherphase abgedampft wurde, welche anschließend in einem Glasbehälter in einem Stickstoff-Strom getrocknet wurde. 100  $\mu\text{l}$  N,O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA; Pierce Chemical Co.) und 200  $\mu\text{l}$  Acetonitril wurden zugegeben, um die Hydroxyl-Gruppen zu derivatisieren. Die Reaktion wurde bei 70°C für 15 Minuten ausgeführt. Die Produkte wurden in Stickstoff getrocknet, in 100  $\mu\text{l}$  Chloroform gelöst und in ein Gaschromatograph-Behältnis gegeben. 2  $\mu\text{l}$  jeder Probe wurden auf einer SP2340 Fused-Silica-Kapillarsäule (30 m, 0,75 mm ID, 0,20 mm Film, Supelco) analysiert, wobei ein Hewlett-Packard-Gaschromatograph der Serie 5890 II verwendet wurde. Die Proben wurden nicht aufgeteilt, das Temperaturprogramm betrug 195°C für 18 min, wurde mit 25°C/min auf 230°C erhöht, bei 230°C für 5 min gehalten und anschließend mit 25°C/min auf 195°C abgesenkt, und es wurden Flammenionisations-Detektoren verwendet.

**[0101]** Die chromatographische Elutionszeit von Methylestern und O-TMS-Derivaten von Rizinolsäure, Lesquerolsäure und Auricolsäure wurde durch GC-MS der Lipidproben von Samen von *L. fendleri* und Vergleich mit veröffentlichten Chromatogrammen von Fettsäuren dieser Spezies etabliert (Carlson et al., 1990). Es wurde ein O-TMS-Methyl-Rizinoleat-Standard aus Rizinolsäure hergestellt, die von Sigma Chemicals Co (St. Louis, MO) erhalten wurde. O-TMS-Methyl-Lesqueroleat-Standards und O-TMS-Methyl-Auricolat-Standards wurden ausgehend von Triacylglycerolen, die aus Samen von *L. fendleri* gereinigt worden waren, hergestellt. Das Massenspektrum von O-TMS-Methyl-Rizinoleat, O-TMS-Methyl-Densipoleat, O-TMS-Methyl-Lesqueroleat und O-TMS-Methyl-Auricolat sind jeweils in den [Fig. 1A–D](#) gezeigt. Die Struktur der charakteristischen Ionen,

die während der Massenspektrometrie dieser Derivate erzeugt werden, sind in [Fig. 2](#) gezeigt.

**[0102]** Die aus dem transgenen Gewebe extrahierten Lipide wurden durch Gaschromatographie und Massenspektrometrie auf das Vorhandensein von hydroxylierten Fettsäuren untersucht. Zum Zwecke der Referenz sei darauf verwiesen, dass die durchschnittliche Fettsäurezusammensetzung von Blättern in einer Arabidopsis-Wildtyp-Linie und einer fad2-Mutanten-Linien von Miguel und Browse (1992) beschrieben wurden. Gaschromatogramme von methylierten und silylierten Fettsäuren von Samen vom Wildtyp und von einer fah12-transgenen Wildtyppflanze sind in den [Fig. 3A](#) bzw. [3B](#) gezeigt. Die Profile sind sehr ähnlich, mit Ausnahme des Vorhandenseins von drei kleinen aber getrennten Peaks bei 14,3, 15,9 und 18,9 Minuten. Ein sehr kleiner Peak bei 20,15 Minuten war ebenfalls zu erkennen. Die Elutionszeit der Peaks bei 14,3 und 18,9 Minuten entsprach exakt denen der zum Vergleich hergestellten Rizinolsäure- bzw. Lesquerolsäure-Standards. In Lipidextrakten von Blättern oder Wurzeln des Wildtyps und der fah12-transgenen Wildtyplinien wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet (Tabelle 1). Obwohl das fah12-Gen in der ganzen Pflanze exprimiert wird, beobachteten wir Auswirkungen auf die Fettsäurezusammensetzung lediglich im Samengewebe. Eine ähnliche Beobachtung wurde bei transgenem fah12-Tabak gemacht.

Fettsäure	Samen				Blatt		Wurzel	
	WT	FAH12/WT	FAH12/fad2	JB12	WT	FAH12/WT	WT	FAH12/WT
16:0	8,5	8,2	6,4	6,1	16,5	17,5	23,9	24,9
16:3	0	0	0	0	10,1	9,8	0	0
18:0	3,2	3,5	2,9	3,5	1,3	1,2	2,0	1,9
18:1	15,4	26,3	43,4	47,8	2,4	3,4	5,4	3,2
18:2	27,0	21,4	10,2	7,2	15,1	14,0	32,2	29,4
18:3	22,0	16,6	-	9,7	36,7	36,0	26,7	30,6
20:1	14,0	14,3	-	13,1	0	0	0	0
22:1	2,0	1,0	0,5	0,5	0	0	0	0
24:1	2,5	1,7	2,0	1,6	0	0	0	0
18:1-OH	0	0,4	0,3	0	0	0	0	0
18:2-OH	0	0,4	0,3	0	0	0	0	0
20:1-OH	0	0,2	0,1	0	0	0	0	0
20:2-OH	0	0,1	0,1	0	0	0	0	0

Tabelle 1: Fettsäurezusammensetzung von Lipiden aus transgenem Arabidopsis und Wildtyp-Arabidopsis. Die Werte sind Mittelwerte, die aus der Analyse von Proben aus drei unabhängigen transgenen Linien oder drei unabhängigen Proben von Wildtyp- und fad2-Linien erhalten wurden.

**[0103]** Um zu bestätigen, dass die beobachteten neuen Peaks in den transgenen Linien den Derivaten von Rizinolsäure, Lesquerolsäure, Densipolsäure und Auricolsäure entsprachen, wurde eine Massenspektrometrie verwendet. Die Fettsäure-Derivate wurden wie oben beschrieben mittels Gaschromatographie aufgetrennt, mit der Ausnahme, dass ein massenselektiver Hewlett-Packard Detektor der 5971-Serie anstelle des Flammenionisationsdetektor aus dem vorherigen Experiment verwendet wurde. Die Spektren der vier neuen Peaks in [Fig. 3B](#) (Peaknummern [10](#), [11](#), [12](#) und [13](#)) sind jeweils in den [Fig. 4A–D](#) gezeigt. Der Vergleich des Spektrums, das für die Standards erhalten wurde, mit dem Spektrum, das für die vier Peaks aus den transgenen Linien erhalten wurde, bestätigte die Identität der vier neuen Peaks. Auf Basis der drei charakteristischen Peaks bei

M/Z 187, 270 und 299 wird Peak **10** unzweifelhaft als O-TMS-Methyl-Rizinoleat identifiziert. Auf Basis der drei charakteristischen Peaks bei M/Z 185, 270 und 299 wird Peak **11** unzweifelhaft als O-TMS-Methyl-Densipoleat identifiziert. Auf Basis der drei charakteristischen Peaks bei M/Z 187, 298 und 327 wird Peak **12** unzweifelhaft als O-TMS-Methyl-Lesqueroleat identifiziert. Auf Basis der drei charakteristischen Peaks bei M/Z 185, 298 und 327 wird Peak **13** unzweifelhaft als O-TMS-Methyl-Auricoleat identifiziert. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die *fah12*-cDNA für eine Hydroxylase kodiert, welche sowohl Ölsäure hydroxyliert, wobei Rizinolsäure entsteht, als auch Icosensäure hydroxyliert, wobei Lesquerolsäure entsteht. Diese Ergebnisse liefern einen weiteren Beleg dafür, dass die Hydroxylase in einer heterologen Pflanzen-Spezies auf so exprimiert werden kann, dass das Enzym katalytisch funktionstüchtig ist. Diese Ergebnisse zeigen ferner, dass die Expression dieses Hydroxylase-Gens zur Akkumulierung von Rizinolsäure, Lesquerolsäure, Densipolsäure und Auricolsäure in einer Pflanzen-Spezies führt, die normalerweise keine hydroxylierten Fettsäuren in extrahierbaren Lipiden akkumuliert.

**[0104]** Das Vorhandensein von Lesquerolsäure in den transgenen Pflanzen wurde in der vorhergehenden Patentanmeldung (Nr. 08/320,982) auf Basis des biochemischen Hinweises, der eine breite Substratspezifität der kappa-Hydroxylase verriet, angenommen. Im Gegensatz dazu war die Akkumulierung von Densipol- und Auricolsäure schlechter vorhersagbar. Da *Arabidopsis* normalerweise keine signifikanten Mengen des nicht-hydroxylierten Vorläufers dieser Fettsäuren umfasst, die als Substrate für die Hydroxylase dienen können, scheint es, dass ein oder mehrere der drei in *Arabidopsis* bekannten n-3-Fettsäure-Desaturasen (z.B. *fad3*, *fad7*, *fad8*; Überblick in Gibson et al., 1995) in der Lage sind, die hydroxylierten Verbindungen an der n-3-Position zu desaturieren. Dies bedeutet, dass Densipolsäure durch die Wirkung einer n-3-Desaturase auf Rizinolsäure produziert wird. Auricolsäure wird durch die Wirkung einer n-3-Desaturase auf Lesquerolsäure produziert. Die *fad3*-Desaturase ist mit annähernder Sicherheit dafür verantwortlich, da sie im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist. Dies kann zukünftig getestet werden, indem *fah12*-enthaltene transgene Pflanzen aus der *fad3*-defizienten Mutante von *Arabidopsis* hergestellt werden (ähnliche Experimente können mit *fad7* und *fad8* durchgeführt werden). Es ist ferner formell möglich, dass die Enzyme, die normalerweise 18:1<sup>cisΔ9</sup> zu 20:1<sup>cisΔ11</sup> elongieren 12OH-18:1<sup>cisΔ9</sup> zu 14OH-20:1<sup>cisΔ11</sup> elongieren und 12OH-18:2<sup>cisΔ9,15</sup> zu 14OH-20:2<sup>cisΔ11,17</sup>.

**[0105]** Die Menge der verschiedenen Fettsäuren in Lipiden von Samen, Blatt und Wurzel der Kontrolle und der transgenen Pflanzen ist in Tabelle 1 dargestellt. Obwohl die Menge an hydroxylierten Fettsäuren, die in diesem Beispiel produziert wurden, geringer ist, als es für die kommerzielle Produktion von Rizinoleat und anderen hydroxylierten Fettsäuren aus Pflanzen erwünscht ist, streben wir zahlreiche Verbesserungen dieser Erfindung an, die das Niveau der Akkumulierung von hydroxylierten Fettsäuren in Pflanzen, welche das *fah12*-Hydroxylase-Gen oder verwandte Hydroxylase-Gene exprimieren, erhöhen werden. Verbesserungen beim Ausmaß und bei der Gewebespezifität der Expression des Hydroxylase-Gens sind angestrebt. Verfahren, die dies durch Verwendung eines starken, samenspezifischen Promotors, wie dem Napin-Promotor aus *B. napus*, oder durch Verwendung der nativen Promotoren des *fah12*-Gens aus *Rizinus* oder des entsprechenden Hydroxylase-Gens von *L. fendleri*, erreichen werden, werden für den Fachmann offensichtlich sein. Zusätzliche angestrebte Verbesserungen betreffen die Modifikation der Enzyme, welche die hydroxylierten Fettsäuren von Phosphatidylcholin abspalten, die Verringerung der Aktivität von Enzymen, die hydroxylierte Fettsäuren abbauen, sowie das Ersetzen von Acyltransferasen, die hydroxylierte Fettsäuren zu den sn-1-, sn-2- und sn-3-Positionen der Glycerol-Lipide transferieren. Obwohl Gene für diese Enzyme in der wissenschaftlichen Literatur nicht beschrieben worden sind, kann ihre Nützlichkeit bei der Verbesserung des Ausmaßes der Produktion von hydroxylierten Fettsäuren ohne weiteres basierend auf den Ergebnissen der biochemischen Untersuchungen der Rizinoleat-Synthese abgesehen werden.

**[0106]** Obgleich *Arabidopsis* keine ökonomisch wichtige Pflanzen-Spezies ist, ist sie in weitem Umfang bei Pflanzenbiologen als Modell für höhere Pflanzen anerkannt. Daher soll die Aufnahme dieses Beispiels die allgemeine Nützlichkeit der vorliegend beschriebenen Erfindung zeigen, um die Öl-Zusammensetzung in höheren Pflanzen zu modifizieren. Ein Vorteil der Untersuchung der Expression des neuen Gens in *Arabidopsis* besteht darin, dass beträchtliches Wissen über den Lipid-Metabolismus in diesem System besteht, und eine Sammlung von Mutanten verfügbar ist, die dazu verwendet werden kann, nützliche Informationen in Bezug auf die Biochemie der Fettsäure-Hydroxylierung in Pflanzen-Spezies zu erlangen. Ein weiterer Vorteile besteht darin, dass alle Informationen, die über den Rizinoleat-Metabolismus in *Arabidopsis* erhalten wurden, leicht auf eng verwandte Spezies, wie beispielsweise die Nutzpflanzen *Brassica napus*, *Brassica juncea* oder *Crambe abyssinica*, übertragen werden können, um Rizinoleat, Lesqueroleat und andere hydroxylierte Fettsäuren für die industrielle Verwendung in großen Mengen zu produzieren. Die kappa-Hydroxylase ist für die Produktion von Rizinoleat oder Lesqueroleat in jeder beliebigen Pflanzen-Spezies nützlich, welche signifikante Mengen der Vorläufer, Ölsäure und Icosensäure, akkumuliert. Von besonderem Interesse sind genetisch modifizierte Varianten, die große Mengen Ölsäure akkumulieren. Solche Varianten sind gegenwärtig für Sonnenblume und

Canola verfügbar. Die Produktion von Lesquerolsäure und verwandten Hydroxy-Fettsäuren kann in Spezies erreicht werden, die große Mengen an Icosensäure und anderen langkettigen Monoensäuren akkumulieren. Solche Pflanzen könnten in der Zukunft mittels Gentechnik aus Pflanzen hergestellt werden, die solche Vorläufer normalerweise nicht produzieren. Wir nehmen daher an, dass die Verwendung von kappa-Hydroxylase von allgemeiner Nützlichkeit ist.

## BEISPIEL 2: ISOLIERUNG EINES GENOMISCHEN KLONS FÜR DIE LESQUERELLA-KAPPA-HYDROXYLASE

### Überblick

**[0107]** Nukleotidsequenzregionen, die sowohl in der Rizinus-kappa-Hydroxylase als auch in der Arabidopsis-fad2- $\Delta$ 12-Fettsäure-Desaturase konserviert sind, wurden verwendet, um Oligonukleotid-Primer zu erstellen. Diese wurden mit genomischer DNA von *Lesquerella fendleri* verwendet, um Fragmente mehrerer homologer Gene zu amplifizieren. Diese amplifizierten Fragmente wurden anschließend als Hybridisierungs sonden verwendet, um genomische Klone vollständiger Länge aus einer genomischen Bibliothek von *L. fendleri* zu identifizieren. Hydroxylierte Fettsäuren sind für das Samengewebe von *Lesquerella* sp. spezifisch und werden in vegetativen Geweben nicht in einem nennenswerten Umfang gefunden. Eines der zwei Gene, die durch dieses Verfahren identifiziert wurden, wurde sowohl in Blättern als auch in sich entwickelnden Samen exprimiert, und es wird daher angenommen, dass es der  $\Delta$ 12-Fettsäure-Desaturase entspricht. Das andere Gen wurde in sich entwickelnden Samen im hohen Ausmaß exprimiert, es wurde jedoch nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß in Blättern exprimiert; es handelt sich um die kappa-Hydroxylase dieser Spezies. Die Identität dieses Gens wird durch Einbringen des Gens in transgene Arabidopsis-Pflanzen und Nachweis, dass dies die Akkumulierung von Rizinolsäure, Lesquerolsäure, Densipolsäure und Auricolsäure in den Lipiden des Samens bewirkt, nachgewiesen. Der Promotor dieses Gens ist ebenfalls von Nutzen, da er in der Lage ist, die Expression eines Gens in sich entwickelnden Samen zu einer Zeit zu steuern, zu der Speicherlipide akkumuliert werden. Dieser Promotor ist somit von großem Nutzen für zahlreiche Anwendungen bei der Genmanipulation von Samen, insbesondere bei Mitgliedern der Brassicaceen.

**[0108]** Die verschiedenen Schritte, die an diesem Vorgang beteiligt sind, werden nachfolgend im Detail beschrieben. Sofern nicht anders angegeben, werden zur Manipulation von Nukleinsäuren, Bakterien und Phagen Routineverfahren angewendet wie sie in Sambrook et al. (1989) beschrieben werden.

### Isolierung eines Fragments des kappa-Hydroxylase-Gens aus *Lesquerella*

**[0109]** Oligonukleotid-Primer für die Amplifikation der kappa-Hydroxylase aus *L. fendleri* wurden erstellt, indem Regionen mit hoher Homologie der abgeleiteten Aminosäuresequenz zwischen der Rizinus-kappa-Hydroxylase und der Arabidopsis- $\Delta$ 12-Desaturase (fad2) ausgewählt wurden. Da die meisten Aminosäuren durch mehrere unterschiedliche Kodons kodiert werden, wurden diese Oligonukleotide so erstellt, dass sie alle möglichen Kodons umfassten, die für die entsprechenden Aminosäuren kodieren können. Die Sequenz dieser gemischten Oligonukleotide war:

Oligo 1: TAYWSNCAYMGMNMGNCAYCA (SEQ ID NO: 14)

Oligo 2: RTGRTGNGCNACRTGNGTRTC (SEQ ID NO: 15)

(wobei: Y = C + T; W = A + T; S = G + C; N = A + G + C + T; M = A + C; R = A + G ist).

**[0110]** Diese Oligonukleotide wurde dazu verwendet, ein DNA-Fragment der genomischen DNA von *L. fendleri* durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung der folgenden Bedingungen zu amplifizieren: Ungefähr 100 ng genomischer DNA wurden zu einer Lösung gegeben, die 25 pmol jedes Primers, 1,5 U Taq-Polymerase (Boehringer Mannheim), 200  $\mu$ M dNTPs, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9), 0,1 % (v/v) Triton X-100, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 % (v/v) Formamid enthielt, wobei ein Endvolumen von 50  $\mu$ l erhalten wurde. Die Amplifikationsbedingungen waren: 4 min Denaturierungsschritt bei 94°C, gefolgt von 30 Zyklen bei 92°C für 1 min, 55°C für 1 min, 72°C für 2 min. Ein finaler Extensionsschritt bei 72°C für 5 min schloss das Programm ab.

**[0111]** Nach elektrophoretischer Trennung der Produkte der PCR-Reaktion in Agarosegelen wurden PCR-Produkte von ungefähr 540 bp beobachtet. Zwei dieser Fragmente wurden in pBluescript (Stratagene) kloniert, wodurch die Plasmide pLesq2 und pLesq3 entstanden. Die Sequenz der Inserts in diesen zwei Plasmiden wurde durch Kettenabbruchverfahren bestimmt. Die Sequenz des Inserts von pLesq2 ist als [Fig. 5](#) dargestellt (SEQ ID NO: 1) und die Sequenz des Inserts von pLesq3 ist als [Fig. 6](#) dargestellt (SEQ ID NO: 2). Der hohe Grad an Sequenzidentität zwischen den zwei Klonen verweist darauf, dass diese potentielle Kandidaten waren, entweder eine  $\Delta$ 12-Desaturase oder eine gamma-Hydroxylase zu sein.

## Northern-Analyse

**[0112]** In *L. fendleri* werden hydroxylierte Fettsäuren in großen Mengen in Samenölen gefunden, jedoch nicht in nennenswerten Mengen in den Blättern. Daher besteht ein wichtiges Kriterium bei der Unterscheidung zwischen einer Fettsäure-Desaturase und einer kappa-Hydroxylase darin, dass man erwartet, dass das kappa-Hydroxylase-Gen in Geweben mit einem hohen Gehalt an hydroxylierten Fettsäuren stärker exprimiert wird als in anderen Geweben, wohingegen alle Pflanzengewebe mRNA für eine  $\omega$ 6-Fettsäure-Desaturase enthalten sollten, da zweifach ungesättigte Fettsäuren in den Lipiden aller Gewebe in den meisten oder in allen Pflanzen gefunden werden. Daher war es von großem Interesse zu bestimmen, ob das Gen, welches pLesq2 entspricht, ebenfalls nur in Samen exprimiert wird, oder ob es auch in anderen Geweben exprimiert wird. Dieser Frage wurde nachgegangen, indem man die Hybridisierung von pLesq2 an RNA, die aus sich entwickelnden Samen oder von Blättern erhalten wurde, untersuchte.

**[0113]** Gesamt-RNA wurde aus sich entwickelnden Samen und jungen Blättern von *L. fendleri* unter Verwendung eines Rneasy-RNA-Extraktions-Kits (Qiagen) gemäß den Anweisungen des Herstellers gereinigt. Die RNA-Konzentrationen wurden durch UV-Spektrophotometrie bei  $\lambda = 260$  und  $280$  nm quantifiziert. Um sicherzustellen, dass das für den Northernblot verwendete Gel gleichmäßig beladen wurde, wurden die RNA-Konzentrationen weiter angepasst, nachdem die Fluoreszenz der mit Ethidiumbromid gefärbten und auf einem denaturierenden Testgel getrennten RNA-Proben unter UV-Licht aufgenommen worden war.

**[0114]** Die wie oben beschrieben präparierte Gesamt-DNA aus Blättern und sich entwickelnden Samen wurde elektrophoretisch auf einem Agarosegel getrennt, das Formaldehyd enthielt (Iba et al., 1993). Eine gleiche Menge ( $10 \mu\text{g}$ ) RNA wurde in beide Spuren geladen, und RNA-Standards ( $0,16$  bis  $1,77$  kb-Leiter, Gibco-BRL) wurden in die dritte Spur geladen. Nach der Elektrophorese wurde die RNA vom Gel auf eine Nylonmembran (Hybond N+, Amersham) übertragen und durch Einwirken von UV-Licht auf dem Filter fixiert. Eine  $^{32}\text{P}$ -markierte Sonde wurde durch Random-Priming aus der Insert-DNA des Klons pLesq2 hergestellt und über Nacht bei  $52^\circ\text{C}$  mit der Membran hybridisiert, nachdem diese für 2 Stunden vorhybridisiert worden war. Die Vorhybridisierungslösung enthielt 5X SSC, 10X Denhardt-Lösung,  $0,1\%$  SDS,  $0,1$  M  $\text{KPO}_4$  pH 6,8,  $100 \mu\text{g/ml}$  Lachssperma-DNA. Die Hybridisierungslösung hatte dieselbe Basiszusammensetzung, enthielt jedoch kein SDS und enthielt  $10\%$  Dextransulfat und  $30\%$  Formamid. Der Blot wurde einmal in 2X SSC,  $0,5\%$  SDS bei  $65^\circ\text{C}$  und anschließend in 1X SSC bei derselben Temperatur gewaschen.

**[0115]** Ein kurzes Einwirken (30 min) des Blots auf einen Röntgenfilm zeigte, dass die Sonde pLesq2 mit einer einzelnen Bande hybridisiert, die lediglich in der Spur mit der Samen-RNA vorhanden war (Fig. 7). Der Blot wurde erneut mit dem Insert des pLesq3-Gens als Sonde untersucht, was zu Banden ähnlicher Intensität in den Spuren der Samen und der Blätter führte (Fig. 7).

**[0116]** Diese Ergebnisse zeigen, dass das Gen, welches dem Klon pLesq2 entspricht, in hohem Maße und spezifisch in den Samen von *L. fendleri* exprimiert wird. In Verbindung mit der Kenntnis der Nukleotidsequenz und der abgeleiteten Aminosäuresequenz ist eine Samen-spezifische Expression des Gens, das dem Insert in pLesq2 entspricht, ein überzeugender Indikator einer Rolle des Enzyms bei der Synthese von hydroxylierten Fettsäuren in Samenöl.

## Charakterisierung eines genomischen Klons für die gamma-Hydroxylase

**[0117]** Genomische DNA wurde wie von Murray und Thompson (1980) beschrieben aus jungen Blättern von *L. fendleri* isoliert. Eine genomische Bibliothek aus einem partiellem Sau3AI-Verdau, die in dem Vektor  $\lambda$ DashII (Stratagene, 11011 North Toorey Pines Road, La Jolla, CA 92037) konstruiert wurde, wurde durch partielles Verdauen von  $500 \mu\text{g}$  DANN, Größenselektion der DNA in einem Sucrosegradient (Sambrook et al., 1989) und Ligieren der DNA (durchschnittliche Größe  $12$  kb) mit dem BamHI-verdauten Arm von  $\lambda$ DashII hergestellt. Die gesamte Ligation wurde gemäß den Bedingungen des Herstellers gesammelt und auf den *E. coli* Stamm XL1-Blue MRA-P2 (Stratagene) ausplattiert. Dies ergab  $5 \times 10^5$  primäre rekombinante Klone. Die Bibliothek wurde anschließend gemäß den Bedingungen des Herstellers amplifiziert. Eine Fraktion der genomischen Bibliothek wurde auf *E. coli* XL1-Blue ausplattiert, und die resultierenden Plaques ( $150000$ ) wurden gemäß den Bedingungen des Herstellers auf geladene Nylonmembranen (Hybond N+, Amersham) überführt. Die DNA wurde mittels UV in einem Stratalinker (Stratagene) mit den Filtern quervernetzt.

**[0118]** Mehrere Klone, die genomische DNA-Sequenzen trugen, welche der Hydroxylase von *L. fendleri* entsprachen, wurden isoliert, indem man die Membranen mit dem Insert von pLesq2 als Sonde untersuchte, das mittels PCR mit internen Primer amplifiziert und mit  $^{32}\text{P}$  durch Random-Priming markiert worden war. Die Filter

wurden für 2 Stunden bei 65°C in 7 % SDS, 1 mM EDTA, 0,25 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,2), 1 % BSA prähybridisiert und für 16 Stunden in derselben Lösung mit der Sonde hybridisiert. Die Filter wurden nacheinander bei 65°C in Lösungen gewaschen, die 2X SSC, 1X SSC, 0,5 X SSC und zusätzlich 0,1 % SDS enthielten. Ein 2,6 kb-XbaI-Fragment, das die vollständige kodierende Sequenz für die gamma-Hydroxylase und ungefähr 1 kb der 5'-stromaufwärts gelegenen Region enthielt, wurde in die entsprechende Stelle des pBluescript KS subkloniert, wobei das Plasmid pLesq-Hyd entstand, und die Sequenz wurde vollständig durch das Dideoxy-Kettenabbruchs-Verfahren unter Verwendung eines automatischen Sequenziergerätes bestimmt. Die Sequenzdaten wurden unter Verwendung des Programms DNASIS (Hitachi Company) untersucht.

**[0119]** Die Sequenz des Inserts von Klon pLesq-Hyd ist in den [Fig. 8A–B](#) gezeigt. Die Sequenz enthält 1855 bp kontinuierliche DNA-Sequenz (SEQ ID NO: 3). Der Klon kodiert eine 5'-nicht-translatierte Region von 401 bp (d.h. Nukleotide, die dem ersten ATG-Kodon voranstehen), einen offenen Leserahmen von 1152 bp sowie eine 3'-untranslatierte Region von 302 bp. Der offene Leserahmen kodiert ein Protein von 384 Aminosäuren mit einem vorhergesagten Molekulargewicht von 44370 (SEQ ID NO: 4). Der Amino-Terminus weist keine Merkmale eines typischen Signalpeptids auf (von Heijne, 1985).

**[0120]** Das genaue Translations-Initiations-Methionin ist experimentell nicht bestimmt worden; man nimmt jedoch auf Basis der abgeleiteten Aminosäuresequenz-Homologie zu der Rizinus-kappa-Hydroxylase (unten angemerkt) an, dass es sich um das Methionin handelt, welches von dem ersten ATG-Kodon bei Nukleotid 402 kodiert wird.

**[0121]** Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von pLesq-Hyd mit Sequenzen Membran-gebundener Desaturasen und der Rizinus-Hydroxylase ([Fig. 9A–B](#)) zeigt, dass pLesq-Hyd homolog zu diesen Genen ist. Die Figur zeigt ein Alignment der Hydroxylase von *L. fendleri* (SEQ ID NO: 4) mit der Hydroxylase von Rizinus (van de Loo et al., 1995), der Arabidopsis fad2-cDNA, die eine im endoplasmatischen Retikulum lokalisierte Δ12-Desaturase (fad2 genannt) kodiert (Okuley et al., 1994), zwei fad2-Desaturase-Klonen aus der Sojabohne, einem Brassica napus-fad2-Klon, einem Zea mays-fad2-Klon und der partiellen Sequenz eines fad2-Klons aus *R. communis*. Der hohe Grad an Sequenzhomologie verweist darauf, dass die Genprodukte ähnliche Funktionen aufweisen. So beträgt beispielsweise die Gesamthomologie zwischen der Lesquerella-Hydroxylase und der Arabidopsis-fad2-Desaturase 92,2 % Ähnlichkeit und 84,8 % Identität, und die zwei Sequenzen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Länge lediglich in einer Aminosäure.

#### Southern-Hybridisierung

**[0122]** Die Southernanalyse wurde verwendet, um die Kopienzahl der Gene im Genom von *L. fendleri* zu bestimmen, die dem pLesq-Hyd-Klon entsprachen. Genomische DNA (5 µg) wurde mit EcoRI, HindIII und XbaI verdaut und auf einem 0,9%igen Agarosegel getrennt. Die DNA wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers mittels Alkali-Blot auf eine geladene Nylonmembran (Hybond N+, Amersham) übertragen. Der Blot wurde für 2 Stunden bei 65°C in 7 % SDS, 1 mM EDTA, 0,25 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,2), 1 % BSA vorhybridisiert und für 16 Stunden in derselben Lösung mit der Sonde hybridisiert, wobei das pLesq-Hyd-Insert mit internen Primern PCR-amplifiziert und durch Random-Priming mit <sup>32</sup>P markiert worden war. Die Filter wurden nacheinander bei 65°C in Lösungen gewaschen, die 2X SSC, 1X SSC, 0,5X SSC und zusätzlich 0,1 % SDS enthielten und anschließend einem Röntgenfilm ausgesetzt.

**[0123]** Die Sonde hybridisierte mit einer einzelnen Bande in jedem Verdau der DNA von *L. fendleri* ([Fig. 10](#)), was darauf verweist, dass das Gen, von dem pLesq-Hyd transkribiert wird, in einer einzelnen Kopie im Genom von *L. fendleri* vorliegt.

#### Expression von pLesq-Hyd in transgenen Pflanzen

**[0124]** Es gibt eine große Vielzahl von Pflanzen-Promotorsequenzen, die verwendet werden können, um eine Gewebe-spezifische Expression von klonierten Genen in transgenen Pflanzen zu bewirken. Der Napin-Promotor und die Promotoren des Acylcarrierproteins sind beispielsweise bereits zuvor bei der Modifikation der Zusammensetzung von Samenöl durch Expression einer Antisense-Form einer Desaturase verwendet worden (Knutsen et al., 1992). Von dem Promotor der β-Untereinheit des Sojabohnen-β-Conglycinin ist gezeigt worden, dass er in hohem Maße aktiv ist und zu einer Gewebe-spezifischen Expression in transgenen Pflanzen anderer Spezies als der Sojabohne führt (Bray et al., 1987). Obwohl wir die Verwendung des kappa-Hydroxylase-Promotors aus *L. fendleri* in den vorliegenden Beispielen beschrieben haben, können auch andere Promotoren für die Herstellung einer modifizierter Samenöl-Zusammensetzungen verwendet werden, die zu einer Samen-spezifischer Expression führen. Solche Modifikationen der vorliegend beschriebenen Erfindung wer-

den für den Fachmann offensichtlich sein.

**[0125]** Konstrukte für die Expression der kappa-Hydroxylase von *L. fendleri* in Pflanzenzellen werden wie folgt hergestellt: Ein 13 kb-Sall-Fragment, welches das pLesq-Hyg-Gen enthielt, wurde in die XhoI-Schnittstelle des binären Ti-Plasmid-Vektors pSLJ44026 (Jones et al., 1992) ([Fig. 11](#)) kloniert, wobei das Plasmid pTi-Hyd entstand, und durch Elektroporation in den *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm GV3101 transformiert. Der Stamm GV3101 (Koncz und Schell, 1986) enthält ein „unbewaffnetes“ (disarmed) Ti-Plasmid. Zellen für die Elektroporation wurden wie folgt hergestellt. GV3101 wurde in LB-Medium mit verringertem NaCl (5 g/l) angezchtet. Eine 250 ml-Kultur wurde bis zu einer  $OD_{600} = 0,6$  angezchtet und anschließend bei 4000 UpM für 15 Minuten zentrifugiert (Sorvall GS-A-Rotor). Der Überstand wurde unverzüglich von dem lockeren Pellet abgezogen, und das Pellet wurde vorsichtig in 500 ml eiskaltem Wasser resuspendiert. Die Zellen wurden wie zuvor zentrifugiert, in 30 ml eiskaltem Wasser resuspendiert, und in ein 30 ml-Gefäß transferiert und bei 5000 UpM für 5 min zentrifugiert (Sorvall SS-34-Rotor). Dies wurde dreimal wiederholt, wobei die Zellen nacheinander in 30 ml eiskaltem Wasser, 30 ml eiskaltem 10%igem Glycerol und schließlich in 0,75 ml eiskaltem 10%igen Glycerol resuspendiert wurden. Die Zellen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**[0126]** Bei den Elektroporationen wurde ein Biorad-Gene-Pulsar-Instrument unter Verwendung kalter 2 ml-gap-Küvetten, die 40  $\mu\text{l}$  Zellen und 1  $\mu\text{l}$  DNA in Wasser enthielten, bei einer Spannung von 2,5 KV und 200 Ohm Widerstand eingesetzt. Die elektroporierten Zellen wurden mit 1 ml SOC-Medium (Sambrook et al., 1989, Seite A2) verdünnt und bei  $28^{\circ}\text{C}$  für 2–4 Stunden inkubiert, bevor sie auf Kanamycin-enthaltendem Medium (50 mg/l) ausplattiert wurden.

**[0127]** *Arabidopsis thaliana* kann mit den *Agrobacterium*-Zellen transformiert werden, die das pTi-Hyd enthalten, wie oben in Beispiel 1 beschrieben ist. Das Vorhandensein von hydroxylierten Fettsäuren in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen kann ebenfalls durch die oben in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren nachgewiesen werden.

#### Konstitutive Expression der Hydroxylase aus *L. fendleri* in transgenen Pflanzen

**[0128]** Ein 1,5 kb-EcoRI-Fragment von pLesq-Hyg, das die gesamte kodierende Region der Hydroxylase umfasste, wurde aus dem Gel gereinigt, und anschließend in die entsprechende Schnittstelle von pBluescript KS (Stratagene) kloniert. Die Plasmid-DNA von mehreren rekombinanten Klonen wurde anschließend mit PstI geschnitten, das jeweils nur einmal in dem Insert und einmal in der Polylinkersequenz des Vektors schneiden sollte. Die Freisetzung eines 920 bp-Fragments mit PstI zeigte die richtige Orientierung des Inserts für weitere Manipulationen. DNA aus einem solchen Klon wurde weiter mit Sall geschnitten, die 5'-Überhänge wurden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aufgefüllt und anschließend mit SacI geschnitten. Das Insert-Fragment wurde aus dem Gel gereinigt und zwischen die Smal- und SacI-Schnittstellen von pBI121 (Clontech) hinter den Blumenkohl-Mosaikvirus 35S-Promotor kloniert. Nachdem geprüft worden war, dass die Sequenz der Verbindung zwischen Insert- und Vektor-DNA passend war, wurde Plasmid-DNA eines rekombinanten Klons verwendet, um *A. tumefaciens* (GV3101) zu transformieren. Kanamycin-resistente Kolonien wurden anschließend wie zuvor beschrieben für eine in planta-Transformation von *A. thaliana* verwendet.

**[0129]** DNA aus Kanamycin-resistenten Keimlingen wurde extrahiert und dazu verwendet, ausgewählte Fragmente der Hydroxylase unter Verwendung von nested-Primern mittels PCR zu amplifizieren. Wenn Fragmente der erwarteten Größe amplifiziert werden konnten, wurden die entsprechenden Pflanzen in einem Gewächshaus oder auf Agarplatten angezchtet, und die Fettsäuren wurden von vollständig ausgebildeten Blättern, Wurzeln und getrockneten Samen extrahiert. Es wurde anschließend eine GC-MS-Analyse wie zuvor beschrieben durchgeführt, um die unterschiedlichen Fettsäure-Arten zu charakterisieren und die Akkumulierung von Hydroxyfettsäuren in transgenen Geweben zu detektieren.

#### BEISPIEL 3 – ERHALT VON ANDEREN PFLANZEN-FETTSÄURE-HYDROXYLASSEN

**[0130]** In einer vorhergehenden Patentanmeldung haben wir Wege beschrieben, auf denen die Rizinus-fah12-Sequenz verwendet werden kann, um andere kappa-Hydroxylasen durch Verfahren wie PCR und heterologe Hybridisierung zu identifizieren. Aufgrund des hohen Grads an Sequenzähnlichkeit zwischen  $\Delta 12$ -Desaturasen und kappa-Hydroxylasen stellt der Stand der Technik jedoch keine Lehre bereit, wie zwischen den beiden Arten von Enzymen ohne funktionalen Test, wie beispielsweise Nachweis der Aktivität in transgenen Pflanzen oder in einem anderen geeigneten Wirt (z.B. transgene mikrobielle oder tierische Zellen), unterschieden werden kann. Die Identifizierung der Hydroxylase aus *L. fendleri* sorgt für die Entwicklung von

Kriterien, mittels derer eine Hydroxylase und eine Desaturase allein auf Basis der abgeleiteten Aminosäuresequenz-Information voneinander unterschieden werden können.

**[0131]** Die [Fig. 9A–B](#) zeigen ein Sequenz-Alignment der Hydroxylase-Sequenzen aus *Rizinus* und *L. fendleri* mit der Hydroxylase-Sequenz aus *Rizinus* und allen öffentlich verfügbaren Sequenzen aller mikrosomaler  $\Delta 12$ -Fettsäure-Desaturasen aus Pflanzen. Von den 384 Aminosäureresten in der *Rizinus*-Hydroxylase-Sequenz sind mehr als 95 % identisch mit dem entsprechenden Rest in mindestens einer der Desaturase-Sequenzen. Daher ist keiner dieser Reste für die katalytischen Unterschiede zwischen Hydroxylase und Desaturase verantwortlich. Von den verbleibenden 16 Resten in der *Rizinus*-Hydroxylase und den 14 Resten in der *Lesquerella*-Hydroxylase stellen alle bis auf sechs Fälle dar, in denen die Hydroxylase-Sequenz einen konservativen Austausch im Vergleich mit einer oder mehreren der Desaturase-Sequenzen aufweist, oder es gibt eine große Variabilität hinsichtlich der Aminosäure in dieser Position in den verschiedenen Desaturasen. Mit konservativ meinen wir, dass die folgenden Aminosäuren funktionell äquivalent sind: Ser/Thr, Ile/Leu/Val/Met, Asp/Glu. Diese strukturellen Unterschiede können somit nicht zu den katalytischen Unterschieden zwischen Desaturasen und Hydroxylasen beitragen. Dies lässt lediglich sechs Aminosäurereste übrig, in denen sowohl die *Rizinus*-Hydroxylase als auch die *Lesquerella*-Hydroxylase von allen bekannten Desaturasen abweichen, und in denen alle bekannten mikrosomalen  $\Delta 12$ -Desaturasen einen identischen Aminosäurerest aufweisen. Diese Reste treten an den Positionen 69, 111, 155, 226, 304 und 331 des Alignments in [Fig. 9](#) auf. Daher unterscheiden diese sechs Reste Hydroxylasen von Desaturasen. Basierend auf dieser Analyse behaupten wir, dass ein beliebiges Enzym mit einer Sequenzidentität von mehr als 60 % zu einem der Enzyme, die in [Fig. 9](#) aufgeführt sind, als Hydroxylase klassifiziert werden kann, wenn es sich von der Sequenz der Desaturasen an diesen sechs Positionen unterscheidet. Aufgrund leichter Unterschiede bezüglich der Anzahl der Reste in einem bestimmten Protein kann die Nummerierung von Protein zu Protein abweichen; der Sinn des Nummerierungssystems wird jedoch ersichtlich sein, wenn das betreffende Protein mit der *Rizinus*-Hydroxylase unter Verwendung des vorliegend gezeigten Nummerierungssystems in einem Alignment gegenübergestellt wird. Somit zeigen die vorliegend offenbarten strukturellen Kriterien in Zusammenhang mit den Verfahren zur Verwendung des *Lesquerella*-Hydroxylase-Gens für die Isolierung homologer Gene, wie Pflanzen-kappa-Hydroxylase-Gene zum Zwecke der genetischen Modifizierung einer Fettsäurezusammensetzung isoliert und identifiziert werden können.

**[0132]** Wenn man überlegt, welche der sechs Substitutionen allein oder primär für die Unterschiede bezüglich der katalytischen Aktivität der erfindungsgemäßen Hydroxylasen und der Desaturasen verantwortlich ist, sehen wir es als wahrscheinlich an, dass das Ersetzen eines Phe durch ein Tyr in Position 226 wegen der bekannten Teilnahme von Tyrosin-Radikalen bei der enzymatischen Katalyse ausschließlich für diesen Unterschied bezüglich der katalytischen Aktivität verantwortlich sein könnte. Andere Substitutionen wie Ala durch Ser in Position 331 können Auswirkungen beim Modulieren der Gesamtgeschwindigkeit der Reaktion haben. Auf dieser Basis streben wir die Erzeugung neuer kappa-Hydroxylasen durch ortsspezifische Mutagenese von  $\Delta 12$ -Desaturasen an. Wir streben ferner die Umwandlung von  $\Delta 15$ -Desaturasen und  $\Delta 9$ -Desaturasen zu Hydroxylasen durch eine ähnliche Anwendung der ortsspezifischen Mutagenese an.

#### ABSCHLIESSENDE BEMERKUNGEN

**[0133]** Durch die obigen Beispiele wird der Nachweis entscheidender Faktoren bei der Herstellung von neuen hydroxylierten Fettsäuren durch Expression eines kappa-Hydroxylase-Gens aus *Rizinus* in transgenen Pflanzen beschrieben. Darüber hinaus wird eine vollständige cDNA-Sequenz der kappa-Hydroxylase von *Lesquerella fendleri* bereitgestellt. Eine vollständige Sequenz der *Rizinus*-Hydroxylase wird ebenfalls in verschiedenen Konstrukten zur Verwendung in Wirtszellen bereitgestellt. Durch diese Erfindung kann man für eine Vielzahl von Anwendungen die Aminosäure- und Nukleinsäuresequenzen erhalten, die für Pflanzen-Fettsäure-Hydroxylasen vielfältigen Ursprungs kodieren.

#### Literaturhinweise

- Beltz, G.A., Jacobs, K.A., Eickbuch, T.H., Cherbas, P.T., Kafatos, F.C. (1983) Isolation of multigene families and determination of homologies by filter hybridization methods. *Methods in Enzymology* 100, 266–285.
- Bray, E.A., Naito, S., Pan, N.S., Anderson, E., Dube, P., Beachy, R. N. (1987) Expression of the  $\beta$ -subunit of  $\beta$ -conglycinin in seeds of transgenic plants. *Planta* 172:364–370.
- Carlson, K.D., Chaudhry, A., Bagby, M.O (1990) Analysis of oil and meal from *lesquerella fendleri* seed. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 67, 438–442.
- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., Helinski, D.R. (1980) Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77,7347–7351.

- Gould, S.J., Subramani, S., Scheffler, I.E. (1989) Use of the DNA polymerase chain reaction for homology probing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1934–1938.
- Hirsinger, F. (1989) New oil crops, in *Oil Crops of the World*, Robbelen, G., Downey, K.R., and Ashri, A., Eds., McGraw-Hill, New York, pp. 518–533.
- Howling, D., Morris, L.J., Gurr, M.I., James, A.T. (1972) The specificity of fatty acid desaturases and hydroxylases. The dehydrogenation and hydroxylation of monoenoic acids, *Biochim. Biophys. Acta* 260, 10.
- Huyuh, T.V., Young, R.A., Davis, R.W. (1985) Constructing and screening cDNA libraries in  $\lambda$ gt10 and  $\lambda$ gt11. In *DNA Cloning, Vol. 1: A Practical Approach*, (ed) D.M. Glover. IRL Press, Washington DC pp 49–77.
- Iba, K., Gibson, S., Nishiuchi, T., Fuse, T., Nishimura, M., Arondel, V., Hugly, S., and Somerville, C. (1993) A gene encoding a chloroplast omega-3 fatty acid desaturase complements alterations in fatty acid desaturation and chloroplast copy number of the *fad7* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 268, 24099–24105.
- Jones, J.D.G., Shlumukov, L., Carland, F., English, J., Scofield, S., Bishop, G.J., Harrison, K. (1992) Effective vectors for transformation, expression of heterologous genes, and assaying transposon excision in transgenic plants. *Transgenic Res.* 1, 285–297.
- Knutson, D.S., Thompson, G.A., Radke, S.E., Johnson, W.B., Knauf, V.C., Kridl, J.C. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2624–2628.
- Koncz, C., Schell, J. (1986) The promoter of  $T_1$ -DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* 204, 383–396.
- Miquel, M., Browse, J. (1992) *Arabidopsis* mutants deficient in polyunsaturated fatty acid synthesis. *J. Biol. Chem.* 267, 1502–1509.
- Murray, M.G., Thompson, W. F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acid Res.* 8, 4321–4325.
- Okukey, J., Lightner, J., Feldman, K., Yadav, N., Lark, E., Browse, J. (1994) *Arabidopsis* FAD2 gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Smith C.R., Jr. (1985) Unusual seed oils and their fatty acids, in *Fatty Acids*, Pryde E.H., Ed., American Oil Chemists' Society, Champaign, Second edition, pp 29–47.
- van de Loo, F.J., Fox, B.G., Somerville, C. (1993) Unusual fatty acids, in *Lipid Metabolism in Plants*, T.S. Moore Jr., Ed., CRC Press, Boca Raton, pp91–126.
- van de Loo, F.N., Turner, S., Somerville, C.R. (1995) An oleate 12-hydroxylase from castor (*Ricinus communis* L.) is a fatty acyl desaturase homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6743–6747.
- von Heijne, G. (1985) Signal sequences. *J. Mol. Biol.* 184, 99–105
- Atsmon, D. (1989) Castor, in *Oil Crops of the World*, Robbelen, G., Downey, K.R., and Ashri, A., Eds., McGraw-Hill, New York, pp. 438–447.
- Bechtold, N., Ellis, J. and Pelletier, G. (1993) In Planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C.R. Acad. Sci. Paris* 316, 1194–1199.

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

- (i) Anmelder: Somerville, Chris; Broun, Pierre
- (ii) TITEL DER ERFINDUNG: HERSTELLUNG VON HYDROXYLIERTEN FETTSÄUREN IN GENETISCH MODIFIZIERTEN PFLANZEN
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 15
- (iv) KORRESPONDENZADRESSE:
  - (A) ADRESSAT: CUSHMAN DARBY & CUSHMAN, LLP
  - (B) STRASSE: 1100 NEW YORK AVENUE, NW
  - (C) STADT: WASHINGTON
  - (D) STAAT: DC
  - (E) LAND: USA
  - (F) POSTLEITZAHL: 20005-3918
- (v) COMPUTERLESBARE FORM:
  - (A) ART DES MEDIUMS: Floppy disk
  - (B) COMPUTER: IBM PC kompatibel
  - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
  - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25
- (iv) GEGENWÄRTIGE DATEN ZUR ANMELDUNG:
  - (A) ANMELDENUMMER: PCT/US95/11855
  - (B) EINREICHUNGSDATUM: 25. September 1995
  - (C) KLASSIFIKATION:
- (viii) INFORMATIONEN ZU ANWALT/VERTRETER:
  - (A) NAME: Kokulis, Paul N.
  - (B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 16,773
  - (C) REFERENZ/AKTENZEICHEN: 1220/213781
- (ix) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATION:
  - (A) TELEFON: 202-861-3000
  - (B) TELEFAX: 202-822-0944

## (2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 1

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
  - (A) LÄNGE: 543 Nukleotide
  - (B) TYP: Nukleotid
  - (C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzel
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: cDNA
- (ix) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 1:

```

TATTGGCACC GCCGGCACCA TTCCAACAAT GGATCCCTAG AAAAAGATGA AGTCITTTGTC      60
CCACCTAAGA AAGCTGCAGT CANATGSTAT GTCAAATACC TCAACAACCC TCTTGGACGC      120

```

```

ATTCTGGTGT TAACTGTTCA GTTATCCTC GGGTGGCCTT TGTATCTAGC CTTAATGTA      180
TCAGGTAGAC CTTATGATGG TTTCGGTICA CATTTCCTCC CTCATGCACC TATCTTTAAG      240
GACCGTGAAC GCTCCAGAT ATACATCTCA GATGCTGGTA TTCTAGCTGT CTGTTATGGT      300
CTTTACCGTT ACGCTGCTTC ACAAGGATTG ACTGCTATGA TCTGGCTCTA CGGAGTAGCC      360
CTTTTGATAG TGAACITTTT CCTTGTCTTG GTCACITTTCT TGCAGCACAC TCATCCTTCA      420
TTACCTCACT ATGATTC AAC CGAGTGGGAA TGGAITAGAG GAGCTTTGGT TACCGTAGAC      480
AGAGACTATG GAATCTTGAA CAAGGTGTTT CAGAACATAA CAGACACCCA CGTAGCACAC      540
CAC                                                                              543

```

## (2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 2

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- |                         |                |
|-------------------------|----------------|
| (A) LÄNGE:              | 544 Nukleotide |
| (B) TYP:                | Nukleotid      |
| (C) ANZAHL DER STRÄNGE: | einzel         |
| (D) TOPOLOGIE:          | linear         |

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(ix) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 2:

```

TATAGGCACC GGAGGCACCA TTCCAACACA GGATCCCTCG AAAGAGATGA AGTATTTGTC      60
CGAAAGCAGA AATCCGCAAT CAAGTGGTAC GCGGAATACC TCAACAACCC TCCTGGTCCG      120
ATCATGATGT TAACTGTCCA GTTCGTCTC GGATGGCCCT TGTACTTAGC CTTCAACGTT      180
TCTGGCAGAC CCTACAATGG TTTCGGCTCC CATTTCCTCC CCAATGCTCC TA7CTACAAC      240
GACCGTGAAC GCCTCCAGAT TTACATCTCT GATGCTGGTA TTCTAGCCGT CTGTTATGGT      300
CTTTACCGTT ACGCTGTTCG ACAAGGACTA GCCTCAATGA TCTGTCTAAA CGGAGTTCCG      360
CTTCTGATAG TAACTTTTTT CCTCGTCTTG ATCACTTACT TACAACACAC TCACCGTCCG      420
TTGCCTCACT ATGATTCATC AGAGTGGGAT TGGCITAGAG GAGCTTTAGC TACTGTAGAC      480
AGAGACTATG GAATCTTGAA CAAGGTGTTT CATAACATCA CAGACACCCA CGTCCACAC      540
CACT                                                                              544

```

## (2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 3

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- |                         |                 |
|-------------------------|-----------------|
| (A) LÄNGE:              | 1740 Nukleotide |
| (B) TYP:                | Nukleotid       |
| (C) ANZAHL DER STRÄNGE: | einzel          |
| (D) TOPOLOGIE:          | linear          |

(ii) MOLEKÜLART: Genom

(ix) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 3:

ATGAAGCTTT ATAAGAAGTT AGTTTTCTCT GGTGACAGAG AAATTNTGTC AATTGGTAGT	60
GACAGTTGAA GCAACAGGAA CAACAAGGAT GGTGGTGNT GATGCTGATG TGGTGATGTG	120
TTATTCATCA AATACTAAAT ACTACATTAC TTGTTGCTGC CTACTTCTCC TATTTCCTCC	180
CCCACCCATT TTGGACCCAC GANCCTTCCA TTAAACCCCT CTCTCGTGCT ATTCACCAGA	240
AGAGAAGCCA AGAGACAGAG AGAGAGAATG TTCTGAGGAT CATTGCTTTC TTCATCGTTA	300
TTAACGTAAG TTTTTTTTGA CCACTCATAT CTA AAATCTA GTACATGCAA TAGATTAATG	360
ACTGTTCCCT CTTTTGATAT TTTACAGCTT TGAATTCAA GATGGGTGCT GGTGGAAGAA	420
TAATGGTTAC CCCCTCTTCC AAGAAATCAG AAAGTGAAG CCTAAAACGT GGACCATGTG	480
AGAAACCACC ATTCACTGTT AAAGATCTGA AGAAAGCAAT CCCACAGCAT TGTTC AAGC	540
GCTCTATCCC TCGTCTTTC TCCTACCTTC TCACAGATAT CACTTAGT TCTTGCTTCT	600
ACTACGTTGC CACAAATTAC TTCTCTCTTC TTCCTCAGCC TCTCTCTACT TACCTAGCTT	660
GGCCTCTCTA TTGGGTATGT CAAGGCTGTG TCTTAACCGG TATCTGGGTC ATTGGCCATG	720
AATGTGGTCA CCATGCATTC AGTGA CTATC AATGGGTAGA TGACACTGTT GGT TTTATCT	780
TCCATTCCCT CCTTCTCGTC CCTTACTTCT CCTGGAAATA CAGTCATCGT CGTCACCATT	840
CCAACAATGG ATCTCTCGAG AAAGATGAAG TCTTTGTCCC ACCGAAGAAA GCTGCAGTCA	900
AATGGTATGT TAAATACCTC AACAACCCTC TTGGACCGAT TCTGGGTGTA ACAGTTCAGT	960
TTATCCTCGG GTGGCCTTTG TATCTAGCCT TTAATGTATC AGGTAGACCT TATGATGGTT	1020
TGCTTCACA TTTCTTCCCT CATGCACCTA TCTTTAAAGA CCGAGAACGC CTCCAGATA	1080
ACATCTCACA TGCTGGTATT CTAGCTGTCT GTTATGGTCT TTACCGTTAC GCTGCTTCAC	1140
AAGGATTGAC TGCTATGATC TGGCTCTATG GAGTACCGCT TTGATAGTG AAC TTTTCC	1200
TTGTCTGGT AAC TTTCTTG CAGCACACTC ATCCTTCGTT ACCTCATTAT GATTCAACCG	1260
AGTGGGAATG GATTAGAGGA CCTTTGGTTA CGGTAGACAG A GACTATGGA ATATTGAACA	1320
AGGTGTTCCA TAACATAACA GACACACATG TGGCTCATCA TCTCTTTGCA ACTATACGGC	1380
ATTATAACGC AATGGAAGCT ACAGAGGCGA TAAAGCCAAT ACTTGGTGAT TACTACCACT	1440
TGGATGGAAC ACCGTGGTAT GTGGCCATGT ATAGGGAAGC AAAGGAGTGT CTCTATGTAG	1500
AACCGGATAC GGAACGTGGG AAGAAAGGTG TCTACTATTA CAACAATAAG TTATGAGGCT	1560
GATAGGGCGA GAGAAGTGCA ATTATCAATC TTCATTTCCT TGT TTTAGGT GTCTTGTTA	1620
AGAAGCTATG CTTTGTTC AATACTCAG AGTCCATNTA GTTGTGTTCT GGTGCATTTT	1680
GCCTAGTTAT GTGGTGTCCG AAGTTAGTGT TCAAACCTGCT TCCTGCTGTG CTGCCAGTG	1740

AAGAACAAGT TTACGTGTTT AAAATACTCG GAACGAATTG ACCACAANAT ATCCAAAACC 1800  
 GGCTATCCGA ATTCCATATC CGAAAACCGG ATATCCAAAT TTCCAGAGTA CTTAG 1855

## (2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 4

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:  
 (A) LÄNGE: 384 Aminosäuren  
 (B) TYP: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

## (ix) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 4:

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

Gln Ile Tyr Ile Ser Asp Ala Gly Ile Leu Ala Val Cys Tyr Gly Leu  
 225 230 235 240  
 Tyr Arg Tyr Ala Ala Ser Gln Gly Leu Thr Ala Met Ile Cys Val Tyr  
 245 250 255  
 Gly Val Pro Leu Leu Ile Val Asn Phe Phe Leu Val Leu Val Thr Phe  
 260 265 270  
 Leu Gln His Thr His Pro Ser Leu Pro His Tyr Asp Ser Thr Glu Trp  
 275 280 285  
 Glu Trp Ile Arg Gly Ala Leu Val Thr Val Asp Arg Asp Tyr Gly Ile  
 290 295 300  
 Leu Asn Lys Val Phe His Asn Ile Thr Asp Thr His Val Ala His His  
 305 310 315 320  
 Leu Phe Ala Thr Ile Pro His Tyr Asn Ala Met Glu Ala Thr Glu Ala  
 325 330 335  
 Ile Lys Pro Ile Leu Gly Asp Tyr Tyr His Phe Asp Gly Thr Pro Trp  
 340 345 350  
 Tyr Val Ala Met Tyr Arg Glu Ala Lys Glu Cys Leu Tyr Val Glu Pro  
 355 360 365  
 Asp Thr Glu Arg Gly Lys Lys Gly Val Tyr Tyr Tyr Asn Asn Lys Leu  
 370 375 380

## (2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 5

## (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 387 Aminosäuren  
 (B) TYP: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

## (ix) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 5:

Met Gly Gly Gly Gly Arg Met Ser Thr Val Ile Thr Ser Asn Asn Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Lys Lys Gly Gly Ser Ser His Leu Lys Arg Ala Pro His Thr Lys  
 20 25 30  
 Pro Pro Phe Thr Leu Gly Asp Leu Lys Arg Ala Ile Pro Pro His Cys  
 35 40 45  
 Phe Glu Arg Ser Phe Val Arg Ser Phe Ser Tyr Val Ala Tyr Asp Val  
 50 55 60  
 Cys Leu Ser Phe Leu Phe Tyr Ser Ile Ala Thr Asn Phe Phe Pro Tyr  
 65 70 75 80

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

Asn Lys Tyr  
385

## (2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 6

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:  
 (A) LÄNGE: 383 Aminosäuren  
 (B) TYP: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

## (ix) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 6:

```

Met Gly Ala Gly Gly Arg Met Pro Val Pro Thr Ser Ser Lys Lys Ser
1           5           10           15

Glu Thr Asp Thr Thr Lys Arg Val Pro Cys Glu Lys Pro Pro Phe Ser
                20           25           30

Val Gly Asp Leu Lys Lys Ala Ile Pro Pro His Cys Phe Lys Arg Ser
          35           40           45

Ile Pro Arg Ser Phe Ser Tyr Leu Ile Ser Asp Ile Ile Ile Ala Ser
          50           55           60

Cys Phe Tyr Tyr Val Ala Thr Asn Tyr Phe Ser Leu Leu Pro Gln Pro
65           70           75           80

Leu Ser Tyr Leu Ala Trp Pro Leu Tyr Trp Ala Cys Gln Gly Cys Val
                85           90           95

Leu Thr Gly Ile Trp Val Ile Ala His Glu Cys Gly His His Ala Phe
                100           105           110

Ser Asp Tyr Gln Trp Leu Asp Asp Thr Val Gly Leu Ile Phe His Ser
          115           120           125

Phe Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His Arg Arg His
130           135           140

His Ser Asn Thr Gly Ser Leu Glu Arg Asp Glu Val Phe Val Pro Lys
145           150           155           160

Gln Lys Ser Ala Ile Lys Trp Tyr Gly Lys Tyr Leu Asn Asn Pro Leu
                165           170           175

Gly Arg Ile Met Met Leu Thr Val Gln Phe Val Leu Gly Trp Pro Leu
          180           185           190

Tyr Leu Ala Phe Asn Val Ser Gly Arg Pro Tyr Asp Gly Phe Ala Cys
          195           200           205

His Phe Phe Pro Asn Ala Pro Ile Tyr Asn Asp Arg Glu Arg Leu Gln
210           215           220

Ile Tyr Leu Ser Asp Ala Gly Ile Leu Ala Val Cys Phe Gly Leu Tyr
225           230           235           240

```

Arg Tyr Ala Ala Ala Gln Gly Met Ala Ser Met Ile Cys Leu Tyr Gly  
 245 250 255  
 Val Pro Leu Leu Ile Val Asn Ala Phe Leu Val Leu Ile Thr Tyr Leu  
 260 265 270  
 Gln His Thr His Pro Ser Leu Pro His Tyr Asp Ser Ser Glu Trp Asp  
 275 280 285  
 Trp Leu Arg Gly Ala Leu Ala Thr Val Asp Arg Asp Tyr Gly Ile Leu  
 290 295 300  
 Asn Lys Val Phe His Asn Ile Thr Asp Thr His Val Ala His His Leu  
 305 310 315 320  
 Phe Ser Thr Met Pro His Tyr Asn Ala Met Glu Ala Thr Lys Ala Ile  
 325 330 335  
 Lys Pro Ile Leu Gly Asp Tyr Tyr Gln Phe Asp Gly Thr Pro Trp Tyr  
 340 345 350  
 Val Ala Met Tyr Arg Glu Ala Lys Glu Cys Ile Tyr Val Glu Pro Asp  
 355 360 365  
 Arg Glu Gly Asp Lys Lys Gly Val Tyr Trp Tyr Asn Asn Lys Leu  
 370 375 380

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 7

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
  - (A) LÄNGE: 384 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 7:

Met Gly Ala Gly Gly Arg Met Gln Val Ser Pro Pro Ser Lys Lys Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Thr Asp Asn Ile Lys Arg Val Pro Cys Glu Thr Pro Pro Phe Thr  
 20 25 30  
 Val Gly Glu Leu Lys Lys Ala Ile Pro Pro His Cys Phe Lys Arg Ser  
 35 40 45  
 Ile Pro Arg Ser Phe Ser His Leu Ile Trp Asp Ile Ile Ile Ala Ser  
 50 55 60  
 Cys Phe Tyr Tyr Val Ala Thr Thr Tyr Phe Pro Leu Leu Pro Asn Pro  
 65 70 75 80  
 Leu Ser Tyr Phe Ala Trp Pro Leu Tyr Trp Ala Cys Gln Gly Cys Val  
 85 90 95  
 Leu Thr Gly Val Trp Val Ile Ala His Glu Cys Gly His Ala Ala Phe  
 100 105 110

Ser Asp Tyr Gln Trp Leu Asp Asp Thr Val Gly Leu Ile Phe His Ser  
 115 120 125  
 Phe Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His Arg Arg His  
 130 135 140  
 His Ser Asn Thr Gly Ser Leu Glu Arg Asp Glu Val Phe Val Pro Arg  
 145 150 155 160  
 Arg Ser Gln Thr Ser Ser Gly Thr Ala Ser Thr Ser Thr Thr Phe Gly  
 165 170 175  
 Arg Thr Val Met Leu Thr Val Gln Phe Thr Leu Gly Trp Pro Leu Tyr  
 180 185 190  
 Leu Ala Phe Asn Val Ser Gly Arg Pro Tyr Asp Gly Gly Phe Ala Cys  
 195 200 205  
 His Phe His Pro Asn Ala Pro Ile Tyr Asn Asp Arg Glu Arg Leu Gln  
 210 215 220  
 Ile Tyr Ile Ser Asp Ala Gly Ile Leu Ala Val Cys Tyr Gly Leu Leu  
 225 230 235 240  
 Pro Tyr Ala Ala Val Gln Gly Val Ala Ser Met Val Cys Phe Leu Arg  
 245 250 255  
 Val Pro Leu Leu Ile Val Asn Gly Phe Leu Val Leu Ile Thr Tyr Leu  
 260 265 270  
 Gln His Thr His Pro Ser Leu Pro His Tyr Asp Ser Ser Glu Trp Asp  
 275 280 285  
 Trp Leu Arg Gly Ala Leu Ala Thr Val Asp Arg Asp Tyr Gly Ile Leu  
 290 295 300  
 Asn Gln Gly Phe His Asn Ile Thr Asp Thr His Glu Ala His His Leu  
 305 310 315 320  
 Phe Ser Thr Met Pro His Tyr His Ala Met Glu Ala Thr Lys Ala Ile  
 325 330 335  
 Lys Pro Ile Leu Gly Glu Tyr Tyr Gln Phe Asp Gly Thr Pro Val Val  
 340 345 350  
 Lys Ala Met Trp Arg Glu Ala Lys Glu Cys Ile Tyr Val Glu Pro Asp  
 355 360 365  
 Arg Gln Gly Glu Lys Lys Gly Val Phe Trp Tyr Asn Asn Lys Leu Xaa  
 370 375 380

## (2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 8

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 309 Aminosäuen
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 8:

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

Glu Pro Asp Glu Gly Thr Ser Glu Lys Gly Val Tyr Trp Tyr Arg Asn  
 290 295 300

Lys Tyr Leu Arg Val  
 305

## (2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 9

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:  
 (A) LÄNGE: 302 Aminosäuren  
 (B) TYP: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

## (ix) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 9:

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

```

Asn Lys Val Phe His Asn Ile Thr Asp Thr His Val Ala His His Leu
225                230                235                240

Phe Ser Thr Met Pro His Tyr His Ala Met Glu Ala Thr Val Glu Tyr
                245                250                255

Tyr Arg Phe Asp Glu Thr Pro Phe Val Lys Ala Met Trp Arg Glu Ala
                260                265                270

Arg Glu Cys Ile Tyr Val Glu Pro Asp Gln Ser Thr Glu Ser Lys Gly
                275                280                285

Val Phe Trp Tyr Asn Asn Lys Leu Ala Met Glu Ala Thr Val
290                295                300

```

## (2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 10

## (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 372 Aminosäuen
- (B) TYP: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ix) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 10:

```

Met Gly Ala Gly Gly Arg Met Thr Glu Lys Glu Arg Glu Lys Gln Glu
1                5                10                15

Gln Leu Ala Arg Ala Thr Gly Gly Ala Ala Met Gln Arg Ser Pro Val
                20                25                30

Glu Lys Pro Pro Phe Thr Leu Gly Gln Ile Lys Lys Ala Ile Pro Pro
35                40                45

His Cys Phe Glu Arg Ser Val Leu Lys Ser Phe Ser Tyr Val Val His
50                55                60

Asp Leu Val Ile Ala Ala Ala Leu Leu Tyr Phe Ala Leu Ala Ile Ile
65                70                75                80

Pro Ala Leu Pro Ser Pro Leu Arg Tyr Ala Ala Trp Pro Leu Tyr Trp
85                90                95

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

Gly Leu Val Leu His Ser Ser Leu Met Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys
115               120               125

Tyr Ser His Arg Arg His His Ser Asn Thr Gly Ser Leu Glu Arg Asp
130               135               140

Glu Val Phe Val Pro Lys Lys Lys Glu Ala Leu Pro Trp Tyr Thr Pro
145               150               155               160

Tyr Val Tyr Asn Asn Pro Val Gly Arg Val Val His Ile Val Val Gln
165               170               175

```

Leu Thr Leu Gly Trp Pro Leu Tyr Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gly Arg  
 180 185 190  
 Pro Tyr Pro Arg Phe Ala Cys His Phe Asp Pro Tyr Gly Pro Ile Tyr  
 195 200 205  
 Asn Asp Arg Glu Arg Ala Gln Ile Phe Val Ser Asp Ala Gly Val Val  
 210 215 220  
 Ala Val Ala Phe Gly Leu Tyr Lys Leu Ala Ala Ala Phe Gly Val Trp  
 225 230 235 240  
 Trp Val Val Arg Val Tyr Ala Val Pro Leu Leu Ile Val Asn Ala Trp  
 245 250 255  
 Leu Val Leu Ile Thr Tyr Leu Gln His Thr His Pro Ser Leu Pro His  
 260 265 270  
 Tyr Asp Ser Ser Glu Trp Asp Trp Leu Arg Gly Ala Leu Ala Thr Met  
 275 280 285  
 Asp Arg Asp Tyr Gly Ile Leu Asn Arg Val Phe His Asn Ile Thr Asp  
 290 295 300  
 Thr His Val Ala His His Leu Phe Ser Thr Met Pro His Tyr His Ala  
 305 310 315 320  
 Met Glu Ala Thr Lys Ala Ile Arg Pro Ile Leu Gly Asp Tyr Tyr His  
 325 330 335  
 Phe Asp Pro Thr Pro Val Ala Lys Ala Thr Trp Arg Glu Ala Gly Glu  
 340 345 350  
 Cys Ile Tyr Val Glu Pro Glu Asp Arg Lys Gly Val Phe Trp Tyr Asn  
 355 360 365  
 Lys Lys Phe Xaa  
 370

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 11

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
  - (A) LÄNGE: 224 Aminosäuen
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 11:

Trp Val Met Ala His Asp Cys Gly His His Ala Phe Ser Asp Tyr Gln  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Asp Asp Val Val Gly Leu Ile Leu His Ser Cys Leu Leu Val  
 20 25 30  
 Pro Tyr Phe Ser Trp Lys His Ser His Arg Arg His His Ser Asn Thr  
 35 40 45

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

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 12

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
  - (A) LÄNGE: 20 Nukleotide
  - (B) TYP: Nukleotid
  - (C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzel
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA

(ix) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 12:

GCTCTTTTGT GCGCTCATT

20

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 13

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
  - (A) LÄNGE: 20 Nukleotide
  - (B) TYP: Nukleotid
  - (C) ANZAHL DER STRÄNGE: einzel
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA

(ix) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 13:

CGGTACCAGA AAACGCCTTG

20

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 14

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE:	20 Nukleotide
(B) TYP:	Nukleotid
(C) ANZAHL DER STRÄNGE:	einzel
(D) TOPOLOGIE:	linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA

(ix) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 14:

TAYWSNCAYM GNMGNCA YCA

20

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 15

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE:	21 Nukleotide
(B) TYP:	Nukleotid
(C) ANZAHL DER STRÄNGE:	einzel
(D) TOPOLOGIE:	linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA

(ix) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 2:

RTGRTGNGCN ACRTGNGTRT C

21

### Patentansprüche

1. Isoliertes Nukleinsäurefragment, das eine Nukleinsäuresequenz umfasst, welche für eine Fettsäure-Hydroxylase mit einer Aminosäure-Identität von 60% oder mehr in Bezug auf die in SEQ ID NO: 4 dargestellte Aminosäuresequenz kodiert.

2. Isoliertes Nukleinsäurefragment nach Anspruch 1, bei dem die Aminosäure-Identität in Bezug auf die in SEQ ID NO: 4 dargestellte Aminosäuresequenz 90% oder mehr ist.

3. Isoliertes Nukleinsäurefragment nach Anspruch 1, bei dem die Aminosäure-Identität in Bezug auf die in SEQ ID NO: 4 dargestellte Aminosäuresequenz 100% ist.

4. Isoliertes Nukleinsäurefragment, das für ein Polypeptid mit Fettsäure-Hydroxylase-Aktivität kodiert und eine Nukleinsäuresequenz-Identität von 90% oder mehr in Bezug auf die in SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 dargestellte Nukleotidsequenz aufweist.

5. Isolierte Nukleinsäure mit der Nukleotidsequenz von SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 3.

6. Isoliertes Nukleinsäurefragment nach Anspruch 1, wobei das Fragment aus einer Öl-produzierenden Pflanzen-Spezies isoliert ist.

7. Chimäres Gen, das in der Lage ist, veränderte Mengen Rizinolsäure in einer transformierten Pflanzenzelle zu bewirken, wobei das chimäre Gen ein Nukleinsäurefragment nach Anspruch 1 umfasst, wobei das Fragment in funktionsfähiger Weise mit geeigneten regulatorischen Sequenzen verknüpft ist.

8. Chimäres Gen, das in der Lage ist, veränderte Mengen Lesquerolsäure in einer transformierten Pflanzenzelle zu bewirken, wobei das chimäre Gen ein Nukleinsäurefragment nach Anspruch 1 umfasst, wobei das Fragment in funktionsfähiger Weise mit geeigneten regulatorischen Sequenzen verknüpft ist.

9. Chimäres Gen, das in der Lage ist, veränderte Mengen an Fettsäuren in einer transformierten Pflanzenzelle zu bewirken, wobei das chimäre Gen ein Nukleinsäurefragment nach einem der Ansprüche 1 bis 5 umfasst, wobei das Fragment in funktionsfähiger Weise mit geeigneten regulatorischen Sequenzen verknüpft ist.

10. Pflanzen, die das chimäre Gen nach einem der Ansprüche 7 bis 9 umfassen.

11. Pflanze nach Anspruch 10, wobei es sich um Raps, Crambe, Brassica juncea, Brassica nigra, Sumpflinse, Flachs, Sonnenblume, Distel, Baumwolle, Cuphea, Sojabohne, Erdnuß, Kokosnuß, Ölpalme oder Mais handelt.

12. Isoliertes Nukleinsäurefragment nach Anspruch 1, wobei das Fragment von Ricinus communis (L.) (Rizinus) erhältlich ist.

13. Isoliertes Nukleinsäurefragment nach Anspruch 1, wobei das Fragment von Lesquerella fendleri erhältlich ist.

14. Verfahren zu Herstellung von Samenöl, das veränderte Mengen an hydroxylierten Fettsäuren enthält, bei dem man:

- a) eine Pflanzenzelle einer Öl-produzierenden Spezies mit einem chimären Gen transformiert, das eine isolierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 5 umfasst;
- b) ausgehend von den transformierten Pflanzenzellen von Schritt a) fertile Pflanzen anzüchtet;
- c) Nachkommen-Samen von den fertilen Pflanzen von Schritt b) auf die gewünschten Mengen hydroxylierter Fettsäuren untersucht; und
- d) die Nachkommen-Samen von Schritt c) weiterverarbeitet, um Samenöl zu erhalten, das veränderte Mengen an ungesättigten Fettsäuren enthält.

15. Verfahren nach Anspruch 14, bei dem die Nutzpflanze ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Raps, Crambe, Brassica juncea, Canola, Flachs, Sonnenblume, Distel, Baumwolle, Cuphea, Sojabohne, Erdnuß, Kokosnuß, Ölpalme und Mais.

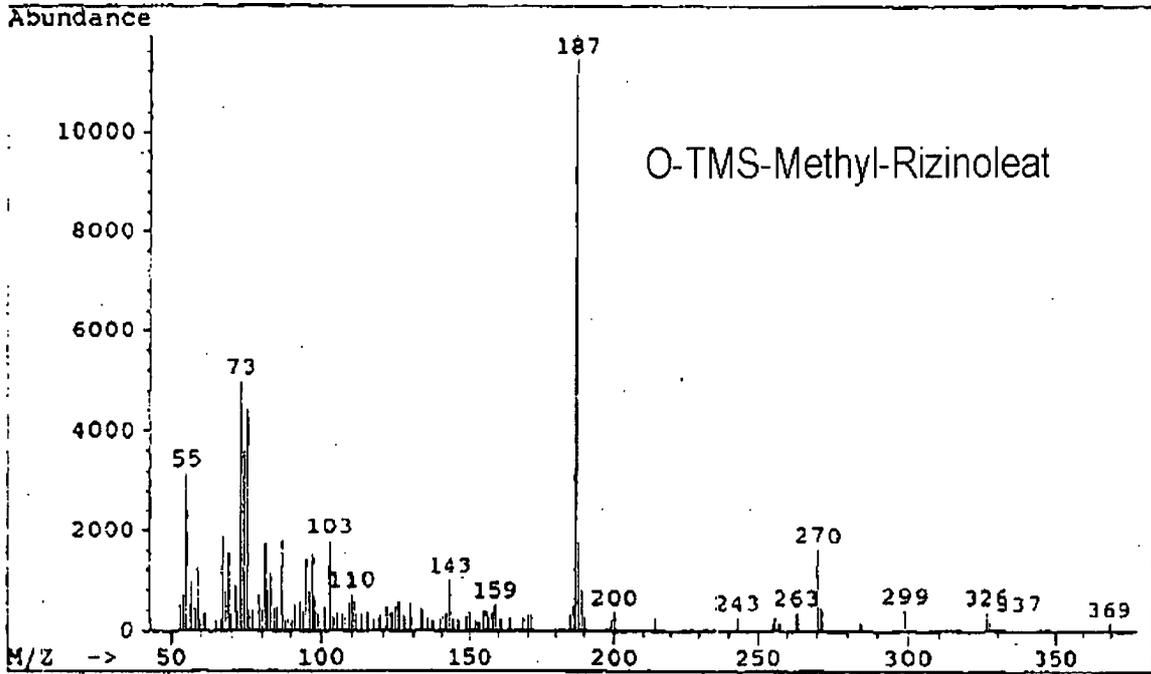
16. Triglycerid-Öl von einer transgenen Pflanze, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Raps, Crambe, Brassica juncea, Canola, Flachs, Sonnenblume, Distel, Baumwolle, Cuphea, Sojabohne, Erdnuß, Kokosnuß, Ölpalme und Mais, wobei die Fettsäure-Zusammensetzung des Öls im Vergleich mit einem Öl, das von derselben Pflanzen-Spezies in nicht-transformierter Form erhalten wird, eine erhöhte Menge an hydroxylierten Fettsäuren enthält, durch ein Verfahren, bei dem man eine Pflanzenzelle, die ein in ihr Genom integriertes DNA-Konstrukt aufweist, welches eine für eine Pflanzen-Hydroxylase kodierende Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 5 umfasst, unter Bedingungen anzüchtet, die die Transkription und Translation der Pflanzen-Hydroxylase in den Pflanzenzellen erlauben.

17. Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäurefragmenten, die für eine Fettsäure-Hydroxylase kodieren, bei dem man:

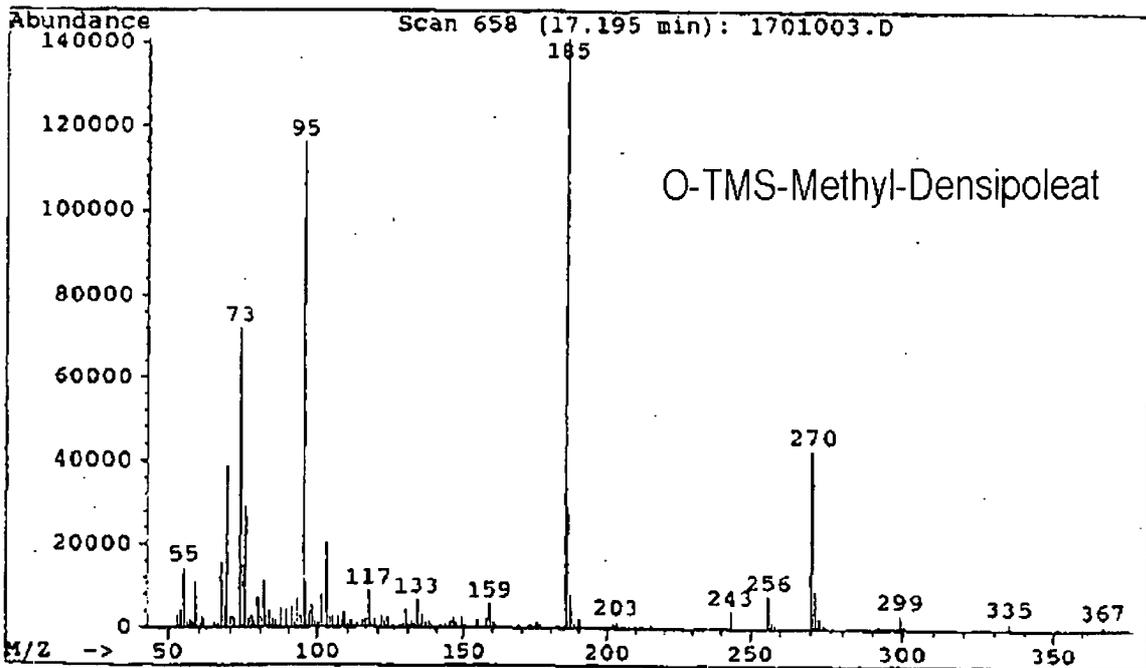
- a) SEQ ID NO: 4 und andere Fettsäure-Hydroxylase-Sequenzen und Fettsäure-Desaturasen vergleicht;
- b) konservierte Sequenzen von 4 oder mehr Aminosäuren, die in Schritt a) erhalten werden, identifiziert;
- c) auf Basis der in Schritt b) identifizierten, konservierten Sequenzen degenerierte Oligomere erstellt;
- d) die degenerierten Oligomere von Schritt c) verwendet, um durch Sequenz-abhängige Methoden Sequenzen zu isolieren, die für Fettsäure-Hydroxylasen kodieren;
- e) ausgehend von der Nukleotidsequenz des Gens die abgeleitete Aminosäuresequenz des kodierten Genprodukts erhält; und
- f) durch Analyse von Aminosäuresequenz-Unterschieden zwischen Fettsäure-Desaturasen und Fettsäure-Hydroxylasen Hydroxylase-Gene von einem Desaturase-Gen unterscheidet.

Es folgen 15 Blatt Zeichnungen

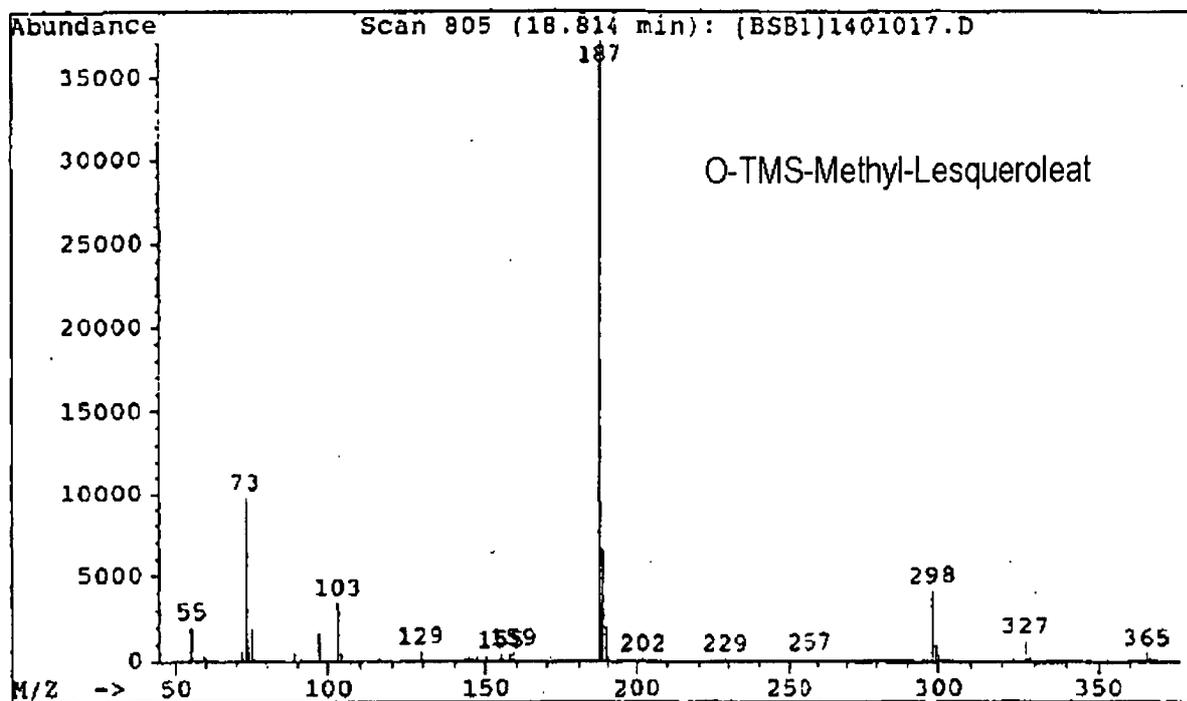
Figur 1A



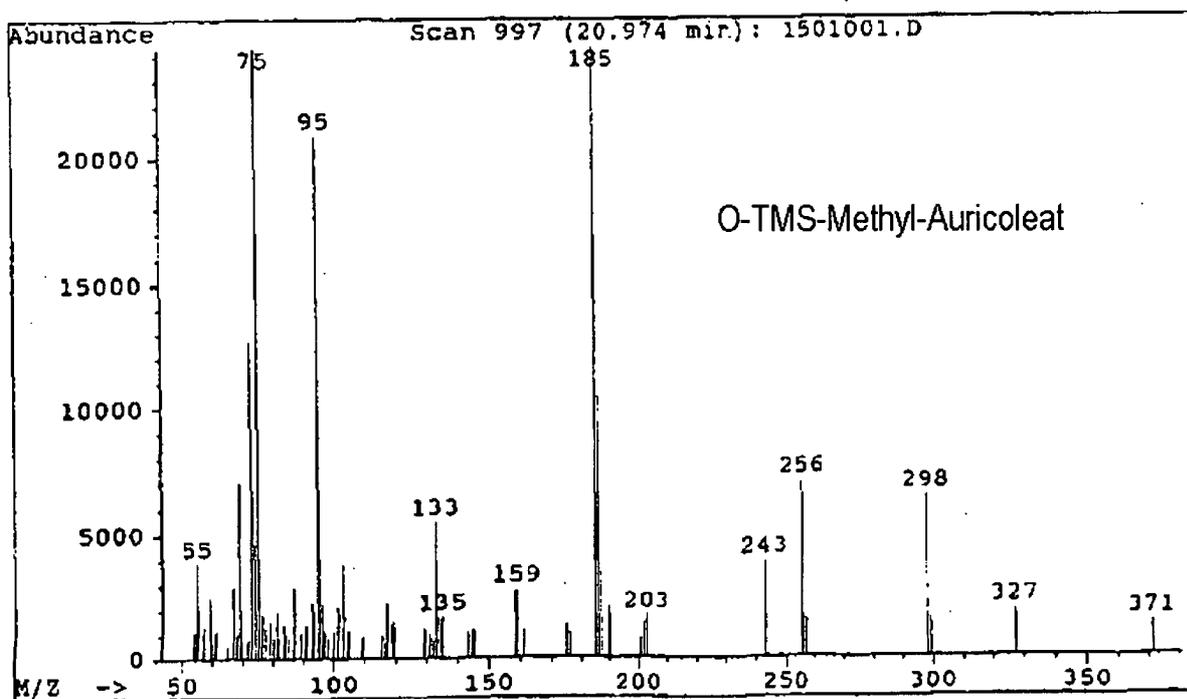
1B

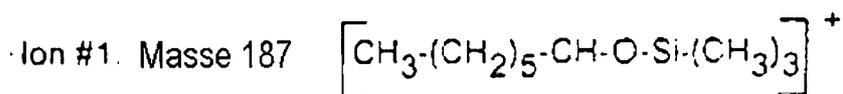


1C

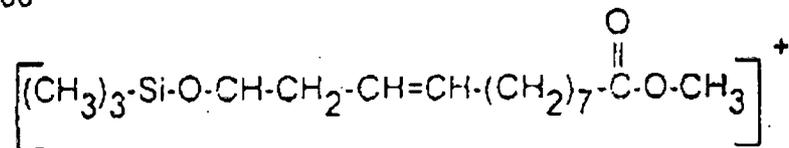


1D

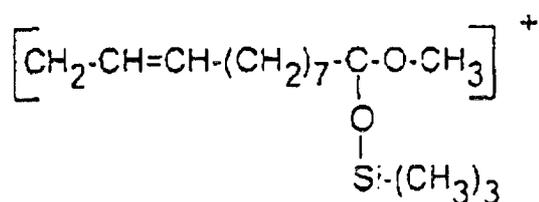




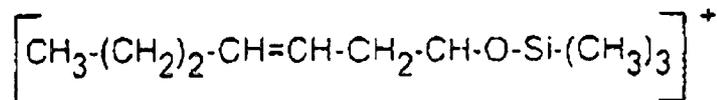
Ion #2. Masse 299



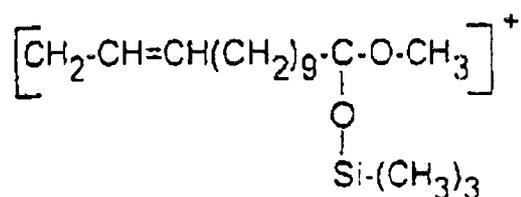
Ion #3. Masse 270 (charakteristisches Umlagerungs-Ion)



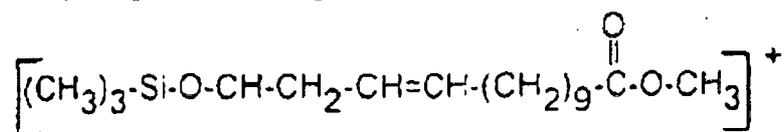
Ion #4: Masse 185 (desaturiertes Analog von Ion #1)



Ion #5: Masse 298 (elongiertes Analog von Ion #3)

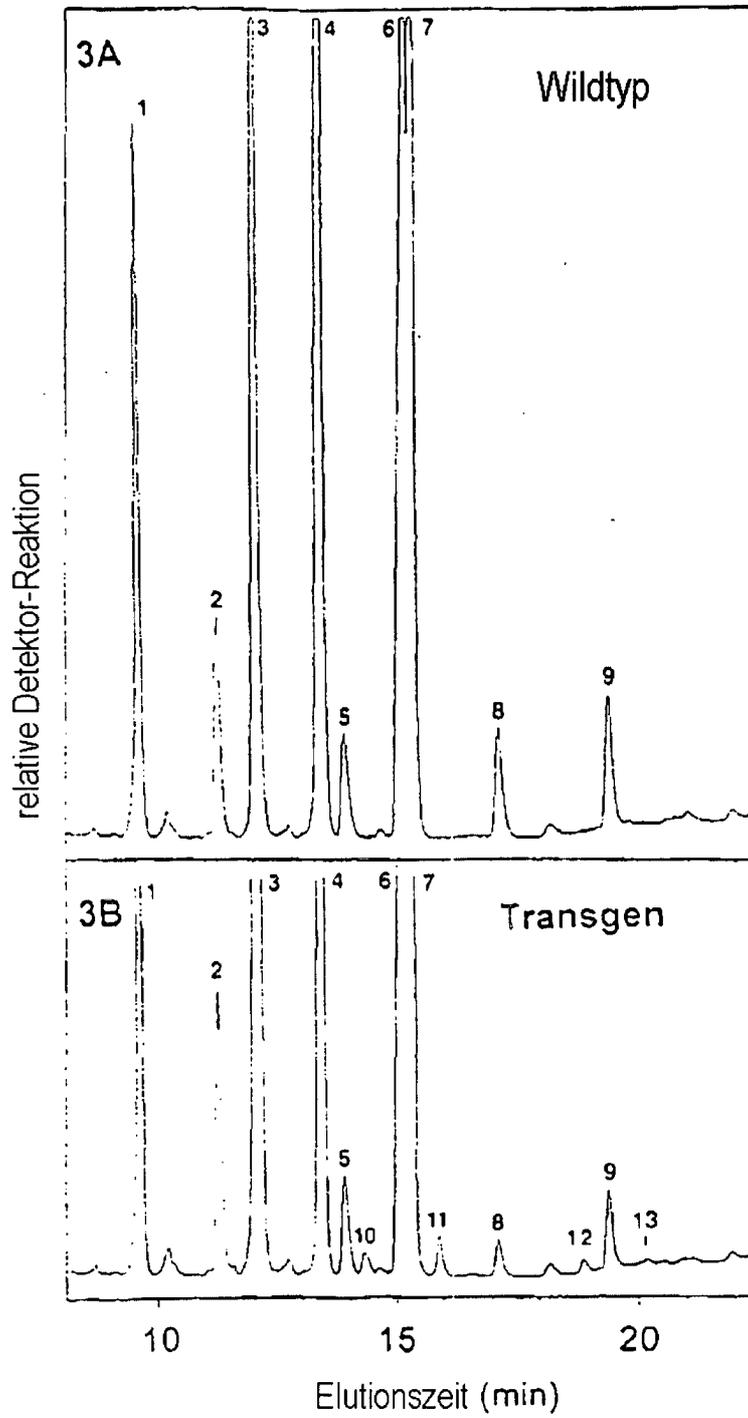


Ion #6: Masse 327 (elongiertes Analog von Ion

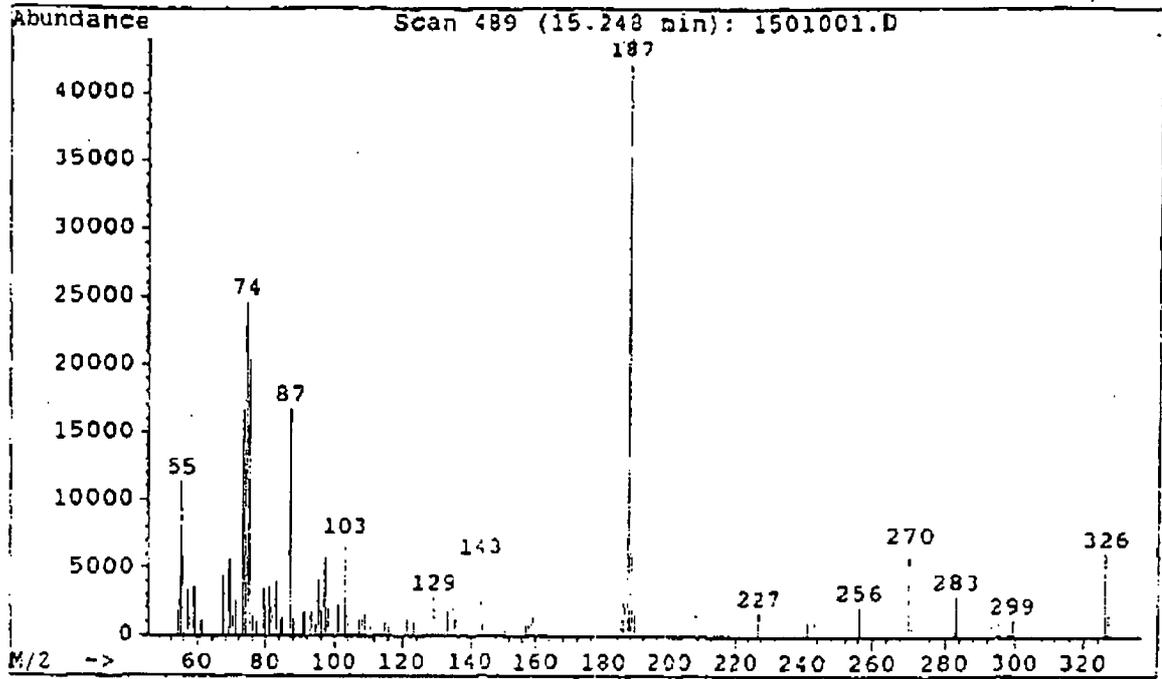


**Figur 2**

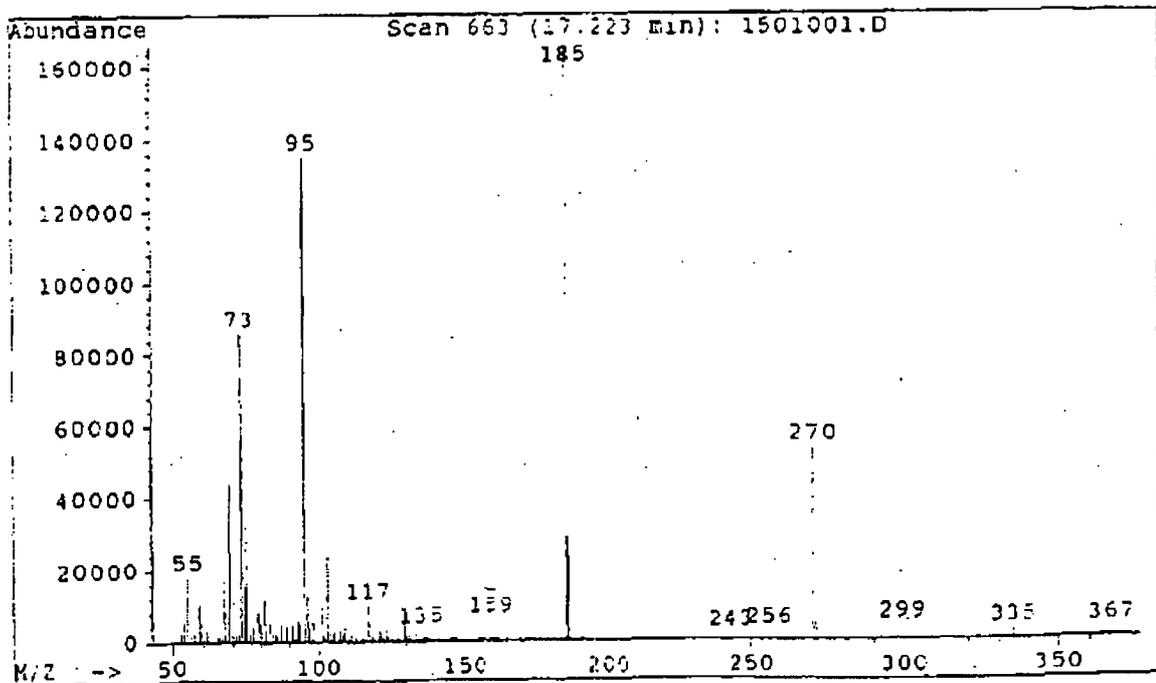
Figur 3



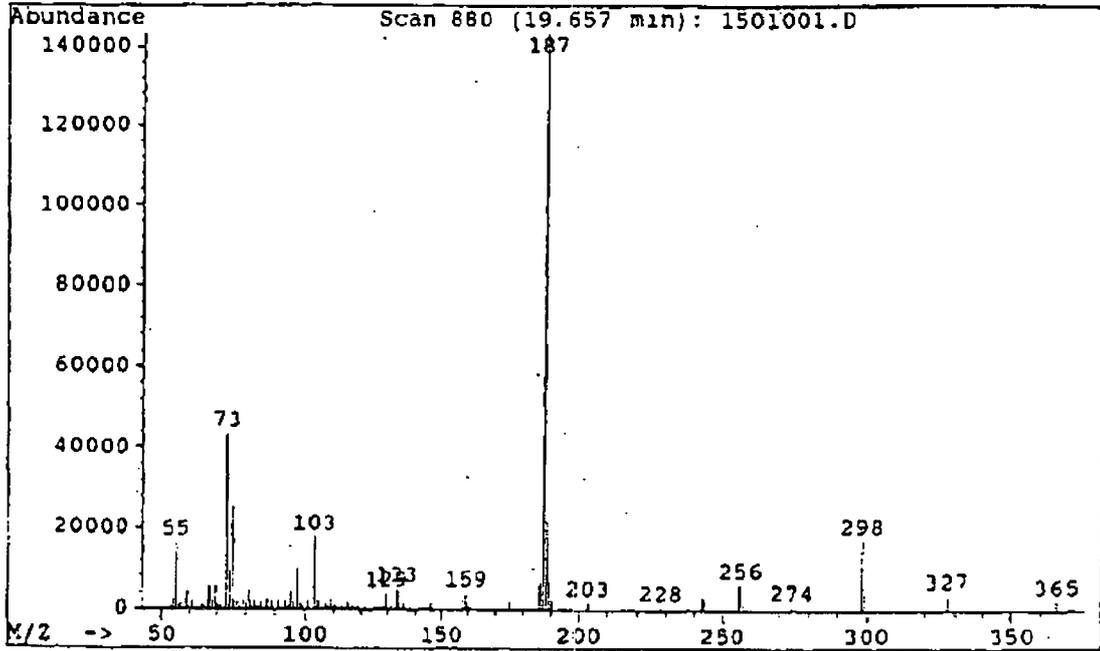
4A Messenspektrum von Peak 10 aus Figur 3B



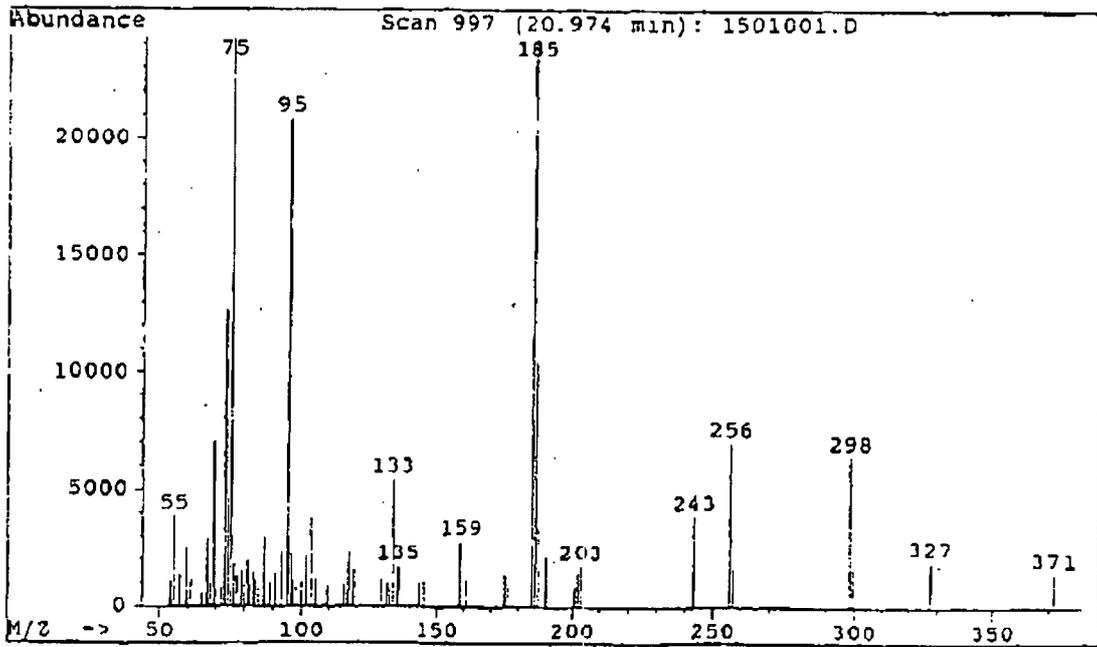
4B Messenspektrum von Peak 11 aus Figur 3B



4C Messenspektrum von Peak 12 aus Figur 3B



4D Messenspektrum von Peak 13 aus Figur 3B

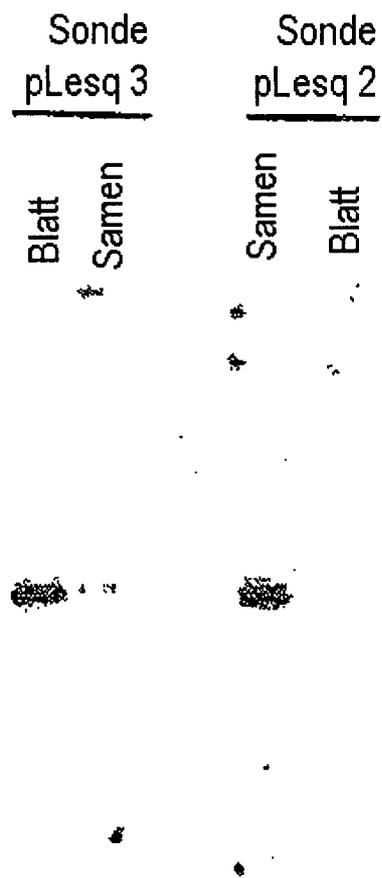


10	20	30	40	50	60
TATTEGCACC	GGCGGCACCA	TTCCAACAAT	GGATCCCTAG	AAAAAGATGA	AGTCTTTGTC
70	80	90	100	110	120
CCACCTAAGA	AAGCTGCAGT	CANATGGTAT	GTCAAATACC	TCAACAACCC	TCTTGGACGC
130	140	150	160	170	180
ATTCTGGTGT	TAACAGTTCA	GTTTATCCTC	GGGTGGCCTT	TGTATCTAGC	CTTTAATGTA
190	200	210	220	230	240
TCAGGTAGAC	CTTATGATGG	TTTCGCTTCA	CATTTCTTCC	CTCATGCACC	TATCTTTAAG
250	260	270	280	290	300
GACCGTGAAC	GTCTCCAGAT	ATACATCTCA	GATGCTEGTA	TTCTAGCTGT	CTGTTATGGT
310	320	330	340	350	360
CTTTACCGTT	ACGCTGCTTC	ACAAGGATTG	ACTGCTATGA	TCTGCGTCTA	CGGAGTACCG
370	380	390	400	410	420
CTTTTATAG	TGAACTTTTT	CCTTGTCTTG	GTCACITTCY	TGCAGCACAC	TCATCCTTCA
430	440	450	460	470	480
TTACCTCACT	ATGATTCAAC	CGAGTGGGAA	TGGATTAGAG	GAGCTTTGGT	TACGSTAGAC
490	500	510	520	530	540
AGAGCTATG	GAATCTTGAA	CAAGGTGTTT	CACAACATAA	CAGACACCCA	CGTAGCACAC
550					
CAC					

Figur 5

10	20	30	40	50	60
TATAGGCACC	GGAGGCACCA	TTCCAAACACA	GGATCCCTCG	AAAGAGATGA	AGTATTTGTC
70	80	90	100	110	120
CCAAAGCAGA	AATCCGCAAT	CAAGTGATAC	GGCGAATACC	TCAACAACCC	TCCTGGTCGC
130	140	150	160	170	180
ATCATGATGT	TAAGTGTCCA	GTTGGTCTCT	GGATGGCCCT	TGTACTTAGC	CTTCAACGTT
190	200	210	220	230	240
TCTGGCAGAC	CCTACAATGG	TTTCGGCTTCC	CATTTCTTCC	CCAATGCTCC	TATETACAAC
250	260	270	280	290	300
GACCGTGAAC	GCCCCAGAT	TTACATCTCT	GATGCTGGTA	TTCTAGCCGT	CTGTTATGGT
310	320	330	340	350	360
CTTTACCGTT	ACGCTGTTGC	ACAAGGACTA	GCCTCAATGA	TCTGTCTAAA	CGGAGTTCCG
370	380	390	400	410	420
CTTCTGATAG	TTAACTTTTT	CCTGGTCTTG	ATCACTTACT	TACAACACAC	TCACCCTGCG
430	440	450	460	470	480
TTGCCCTCACT	ATGATTCATC	AGAGTGGGAT	TGGCTTAGAG	GAGCTTTAGC	TACTGTAGAC
490	500	510	520	530	540
AGAGACTATG	GAATCTTGAA	CAAGGTGTTT	CATAACATCA	CAGACACCCA	CCTCGCACAC
550					
CACT					

**Figur 6**



Figur 7

AT GAA GCT TTA TAA GAA GTT AGT TTT CTC TGG TGA CAG AGA AAT TTT	47
GTC AAT TGG TAG TGA CAG TTG AAG CAA CAG GAA CAA CAA GGA TGG TTG	95
GTS NTG ATG CTG ATG TGG TGA TGT GTT ATT CAT CAA ATA CTA AAT ACT	143
ACA TTA CTT GTT GGT GGC TAC TTC TCC TAT TTC CTC CGC CAC CCA TTT	191
TGG ACC CAG GAN CCT TCC ATT TAA ACC CTC TCT CGT GGT ATT CAC CAG	239
AAG AGA AGC CAA GAG ABA BAG ASA BAG AAT GTT CTG AGG ATC ATT GTC	287
TTC TTC ATC GGT AAT AAC ATA AGT TTT TTT TGA CCA CTC ATA TCT AAA	335
ATC TAG TAC ATG CAA TAG ATT AAT GAC TGT TCC TTC TTT TGA TAT TTT	383
	Met Gly Ala Gly Gly Arg Ile Met Val Thr
CAG CTT CTT GAA TTC AAG ATG GGT GGT GGA AGA ATA ATG GTT ACC	431
Pro Ser Ser Lys Lys Ser Glu Thr Glu Ala Leu Lys Arg Gly Pro Cys	26
CCC TCT TCC AAG AAA TCA GAA AGT GAA GCC CTA AAA CGT GGA CCA TGT	479
Glu Lys Pro Pro Phe Thr Val Lys Asp Leu Lys Lys Ala Ile Pro Gln	42
GAG AAA CCA CCA TTC ACT GTT AAA GAT CTG AAG AAA GCA ATC CCA CAG	527
His Cys Phe Lys Arg Ser Ile Pro Arg Ser Phe Ser Tyr Leu Leu Thr	58
CAT TGT TTC AAG CAC TCT ATC CCT CGT TCT TTC TCC TAC CTT CTC ACA	575
Asp Ile Thr Leu Val Ser Cys Phe Tyr Tyr Val Ala Thr Asn Tyr Phe	74
GAT ATC ACT TTA GTT TCT TGC TTC TAC TAC GTT GCC ACA AAT TAC TTC	623
Ser Leu Leu Pro Gln Pro Leu Ser Thr Tyr Leu Ala Trp Pro Leu Tyr	90
TCT CTT CTT CCT CAG CCT CTC TCT ACT TAC CTA GCT TGG CCT CTC TAT	671
Trp Val Cys Gln Gly Cys Val Leu Thr Gly Ile Trp Val Ile Gly His	106
TGG GTA TGT CAA GGC TGT GTC TTA ACC GGT ATC TGG GTC ATT GGC CAT	719
Glu Cys Gly His His Ala Phe Ser Asp Tyr Gln Trp Val Asp Asp Thr	122
GAA TGT GGT CAC CAT GCA TTC AGT GAC TAT CAA TGG GTA GAT GAC ACT	767
Val Gly Phe Ile Phe His Ser Phe Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp	138
GTT GGT TTT ATC TTC CAT TCC TTC CTT CTC GTC CCT TAC TTC TCC TGG	815
Lys Tyr Ser His Arg Arg His His Ser Asn Asn Gly Ser Leu Glu Lys	154
AAA TAC AGT CAT CGT CGT CAC CAT TCC AAC AAT GGA TCT CTC GAG AAA	863
Asp Glu Val Phe Val Pro Pro Lys Lys Ala Ala Val Lys Trp Tyr Val	170
GAT GAA GTC TTT GTC CCA CCG AAG AAA GCT GCA GTC AAA TGG TAT GTT	911
Lys Tyr Leu Asn Asn Pro Leu Gly Arg Ile Leu Val Leu Thr Val Gln	186
AAA TAC CTC AAC AAC CCT CTT GGA CGC ATT CTG GTG TTA ACA GTT CAG	959

Figur 8A

Phe	Ile	Leu	Gly	Trp	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ala	Phe	Asn	Val	Ser	Gly	Arg	202
TTT	ATC	CTC	GGG	TGG	CCT	TTG	TAT	CTA	GCC	TTT	AAT	GTA	TCA	GGT	AGA	1007
Pro	Tyr	Asp	Gly	Phe	Ala	Ser	His	Phe	Phe	Pro	His	Ala	Pro	Ile	Phe	218
CCT	TAT	GAT	GGT	TTC	GCT	TCA	CAT	TTC	TTC	CCT	CAT	GCA	CCT	ATC	TTT	1055
Lys	Asp	Arg	Glu	Arg	Leu	Gln	Ile	Tyr	Ile	Ser	Asp	Ala	Gly	Ile	Leu	234
AAA	GAC	CGA	GAA	CGC	CTC	CAG	ATA	TAC	ATC	TCA	GAT	GCT	GGT	ATT	CTA	1103
Ala	Val	Cys	Tyr	Gly	Leu	Tyr	Arg	Tyr	Ala	Ala	Ser	Gln	Gly	Leu	Thr	250
GCT	GTC	TGT	TAT	GGT	CTT	TAC	CGT	TAC	GCT	GCT	TCA	CAA	GGA	TTG	ACT	1151
Ala	Met	Ile	Cys	Val	Tyr	Gly	Val	Pro	Leu	Leu	Ile	Val	Asn	Phe	Phe	256
GCT	ATG	ATC	TGC	GTC	TAT	GGA	GTA	CCG	CTT	TTG	ATA	GTG	AAC	TTT	TTC	1199
Leu	Val	Leu	Val	Thr	Phe	Leu	Gln	His	Thr	His	Pro	Ser	Leu	Pro	His	262
CTT	GTC	TTG	GTA	ACT	TTC	TTG	CAG	CAC	ACT	CAT	CCT	TGG	TTA	CCT	CAT	1247
Tyr	Asp	Ser	Thr	Glu	Trp	Glu	Trp	Ile	Arg	Gly	Ala	Leu	Val	Thr	Val	298
TAT	GAT	TCA	ACC	GAG	TGG	GAA	TGG	ATT	AGA	GGA	GCT	TTG	GTT	ACG	GTA	1295
Asp	Arg	Asp	Tyr	Gly	Ile	Leu	Asn	Lys	Val	Phe	His	Asn	Ile	Thr	Asp	314
GAC	AGA	GAC	TAT	GGA	ATA	TTG	AAC	AAG	GTG	TTC	CAT	AAC	ATA	ACA	GAC	1343
Thr	His	Val	Ala	His	His	Leu	Phe	Ala	Thr	Ile	Pro	His	Tyr	Asn	Ala	330
ACA	CAT	GTG	GCT	CAT	CAT	CTC	TTT	GCA	ACT	ATA	CCG	CAT	TAT	AAC	GCA	1391
Met	Glu	Ala	Thr	Glu	Ala	Ile	Lys	Pro	Ile	Leu	Gly	Asp	Tyr	Tyr	His	346
ATG	GAA	GCT	ACA	GAG	GCG	ATA	AAG	CCA	ATA	CTT	GGT	GAT	TAC	TAC	CAC	1439
Phe	Asp	Gly	Thr	Pro	Trp	Tyr	Val	Ala	Met	Tyr	Arg	Glu	Ala	Lys	Glu	352
TTC	GAT	GGA	ACA	CCG	TGG	TAT	GTG	GCC	ATG	TAT	AGG	GAA	GCA	AAG	GAG	1487
Cys	Leu	Tyr	Val	Glu	Pro	Asp	Thr	Glu	Arg	Gly	Lys	Lys	Gly	Val	Tyr	378
TGT	CTC	TAT	GTA	GAA	CCG	GAT	ACG	GAA	CGT	GSG	AAG	AAA	GGT	GTC	TAC	1535
Tyr	Tyr	Asn	Asn	Lys	Leu											384
TAT	TAC	AAC	AAT	AAG	TTA	TGA	GGC	TGA	TAG	GSC	GAG	AGA	AGT	GCA	ATT	1583
ATC	AAT	CTT	CAT	TTC	CAT	GTT	TTA	GGT	GTC	TTG	TTT	AAG	AAG	CTA	TGC	1631
TTT	GTT	TCA	ATA	ATC	TCA	GAG	TCC	ATN	TAG	TTG	TGT	TCT	GGT	GCA	TTT	1679
TGC	CTA	GTT	ATG	TGG	TGT	CGG	AAG	TIA	GTG	TTC	AAA	CTG	CTT	CCT	GCT	1727
GTG	CTG	CCC	AGT	GAA	GAA	CAA	GTT	TAC	GTG	TTT	AAA	ATA	CTC	GGA	ACG	1775
AAT	TGA	CCA	CAA	NAT	ATC	CAA	AAC	CGG	CTA	TCC	GAA	TTC	CAT	ATC	CGA	1823
AAA	CCG	GAT	ATC	CAA	ATT	TCC	AGA	GTA	CTT	AG						1855

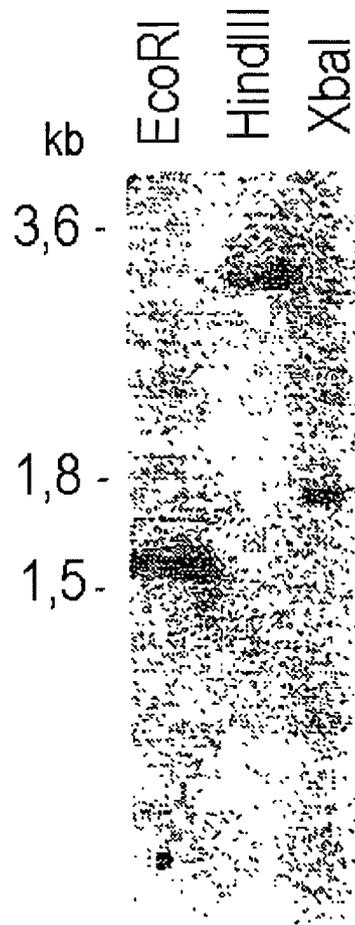
Figur 8B

		10	20	30	40	50	
LFFAH12	1	MGAGGRIM--	--VTPSSKKS	--ETEALKRG	PCEKPPFTVK	DLKKAIPPHC	50
FAH12	1	MGGGGRMSTV	ITSNRSEKKG	--GSSHLKRA	PHTKPPFTLG	DLKKAIPPHC	50
ATFAD2	1	MGAGGRMP--	--VPTSSKKS	--ETDTTKRV	PCEKPPFSVG	DLKKAIPPHC	50
BNFAD2	1	MGAGGRMQ--	--VSPPSKKS	--ETDNKRV	PCETPPFTVG	ELKKAIPPHC	50
GMFAD2-1	1	MGLA-KETTM	GGRGRVAKVE	VQGKKPLSRV	PNTKPPFTVG	QLKKAIPPHC	50
GMFAD2-2	1	MGAGGR----	TDVPPANRKS	--EVDPLKRV	PFEXPOFSL	QIKKAIPPHC	50
ZMFAD2	1	MGAGGRMTEK	EREKOEOLAR	ATGGAAMORS	PVEKPPFTLG	QIKKAIPPHC	50
RCFAD2	1	-----	-----	-----	-----	-----	50
		60	70	80	90	100	
LFFAH12	51	FKRSIPRSFS	YLLTGITLVS	CFYYVATNYF	SLLPOPLSTY	LAWPLYWVCO	100
FAH12	51	FERSFVRSFS	YVAYDVCLSF	LFYSIATNFF	PYISSPLS-Y	VAWLVYWLFO	100
ATFAD2	51	FKRSIPRSFS	YLISGIIIAS	CFYYVATNYF	SLLPOPLS-Y	LAWPLYWACO	100
BNFAD2	51	FKRSIPRSFS	HLIWDIIIAS	CFYYVATTYF	PLLPNPLS-Y	FAWPLYWACO	100
GMFAD2-1	51	FORSLLTSFS	YVVYDLSFAF	TFY-IATTYF	HLLPOPFS-L	IAWPIYWVLO	100
GMFAD2-2	51	FORSVLRFSFS	YVVYDLTIAF	CLYYVATHYF	HLLPGPLS-F	RGMAIYWAVO	100
ZMFAD2	51	FERSVLKFSFS	YVVHDLVIAA	ALLYFALAI	PALPSPLR-Y	AAWPLYWIAO	100
RCFAD2	51	-----	-----	-----	-----	-----	100
		110	120	130	140	150	
LFFAH12	101	GCVLTGIWVI	GHECGHHAFS	DYQWVDDTVG	FIHFSFLLVP	YFSWKYSHRR	150
FAH12	101	GCILTGLWVI	GHECGHHAFS	EYQLADDIVG	LIVHSALLVP	YFSWKYSHRR	150
ATFAD2	101	GCVLTGIWVI	AHECGHHAFS	DYQWLDOTVG	LIFHSFLLVP	YFSWKYSHRR	150
BNFAD2	101	GCVLTGVWVI	AHECGHHAFS	DYQWLDOTVG	LIFHSFLLVP	YFSWKYSHRR	150
GMFAD2-1	101	GCLLTGVWVI	AHECGHHAFS	KYQWVDDVVG	LTLHSTLLVP	YFSWKISHRR	150
GMFAD2-2	101	GCILTGVWVI	AHECGHHAFS	DYQLLDDIVG	LILHSALLVP	YFSWKYSHRR	150
ZMFAD2	101	G-----	-----AFS	DYSLLDVVVG	LVLHSSLMVP	YFSWKYSHRR	150
RCFAD2	101	-----WVM	AHDCGHHAFS	DYQLLDDVVG	LILHSCLLVP	YFSWKHSHRR	150
		160	170	180	190	200	
LFFAH12	151	HHSNNGSLEK	DEVFVPPKKA	AVKWKYVKYL	NNPLGRILVL	TVOFVLGWPL	200
FAH12	151	HHSNIGSLER	DEVFVPKSKS	KISWYSKYS-	NNPPGRVLT	AATLLLGWPL	200
ATFAD2	151	HHSNTGSLER	DEVFVPKOKS	AIKWYGKYL-	NNPLGRIMML	TVOFVLGWPL	200
BNFAD2	151	HHSNTGSLER	DEVFVPR-RS	OTSSGSTAST-	STTFGRVML	TVOFTLGWPL	200
GMFAD2-1	151	HHSNTGSLDR	DEVFVPKPKS	KVAWFSKYL-	NNPLGRAVSL	LVTLTIGWPM	200
GMFAD2-2	151	HHSNTGSLER	DEVFVPKOKS	CIKWYSKYL-	NNPPGRVLT	AVTLTLGWPL	200
ZMFAD2	151	HHSNTGSLER	DEVFVPKKKE	ALPWYTPYVY	NNPVGRVYHI	VVQLTLGWPL	200
RCFAD2	151	HHSNTGSLER	DEVFVPKKKS	SIRWYSKYL-	NNPPGRINTI	AVTLSLGWPL	200
		210	220	230	240	250	
LFFAH12	201	YLAFNVSGRP	YDG-FASHFF	PHAPIFKDRE	RLOIYISDAG	ILAVCYGLYR	250
FAH12	201	YLAFNVSGRP	YDR-FACHYD	PYGPIFSERE	RLOIYIADLG	IFATTFVLYO	250
ATFAD2	201	YLAFNVSGRP	YDG-FACHFF	PNAPIYNDRE	RLOIYISDAG	ILAVCFGLYR	250
BNFAD2	201	YLAFNVSGRP	YDGGFACHFH	PNAPIYNDRE	RLOIYISDAG	ILAVCYGLLP	250
GMFAD2-1	201	YLAFNVSGRP	YDS-FASHYH	PYAPIYSNRE	RLLIYYSOVA	LFSVTYSLYR	250
GMFAD2-2	201	YLALNVSGRP	YDR-FACHYD	PYGPIYSORE	RLOIYISDAG	VLAVVYGLFR	250
ZMFAD2	201	YLATNASGRP	YPR-FACHFD	PYGPIYNDRE	RAQIFVSDAG	VVAVAFGLYK	250
RCFAD2	201	YLAFNVSGRP	YDR-FACHYD	PYGPIYNDRE	RIEIF:SDAG	VLAVTFGLYO	250

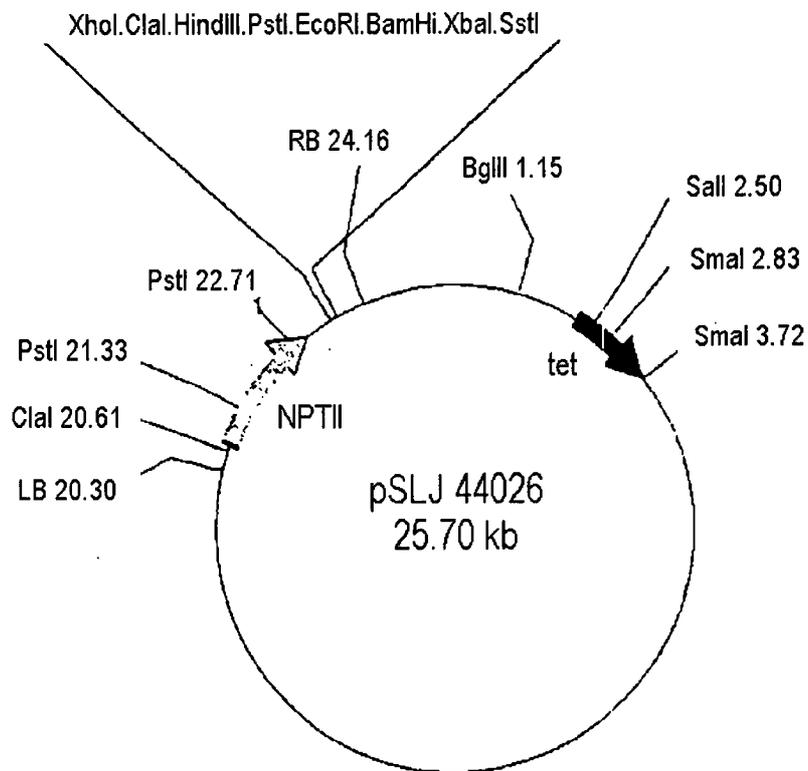
Figur 9A

		260	270	280	290	300	
LFFAH12	251	MAASOGLTAM	ICVYGVPLLI	VNFFLVLVTF	LOHTHPSLPH	YDSTEWEWIR	300
FAH12	251	MTAKGLAWV	MRIYGVPLLI	VNCFLVMITY	LOHTHPAIPR	YGSSEWDWLR	300
ATFAD2	251	MAAAGMASM	ICLYGVPLLI	VNAFLVLITY	LOHTHPSLPH	YDSSEWDWLR	300
BNFAD2	251	MAAVOGVASH	VCFLRVPLLI	VNGFLVLITY	LOHTHPSLPH	YDSSEWDWLR	300
GMFAD2-1	251	WATLKGLVWL	LCVYGVPLLI	VNGFLVTITY	LOHTHPALPH	YDSSEWDWLK	300
GMFAD2-2	251	LAMAKGLANV	VCVYGVPLLV	VNGFLVLITF	LOHTHPALPH	YTSSEWDWLR	300
ZMFAD2	251	LAAAFGVWV	VRVYAVPLLI	VNAWLVLITY	LOHTHPSLPH	YDSSEWDWLR	300
RCFAD2	251	LAIKGLAWV	VCVYGVPLLV	VNSFLVLITF	LOHTHPALPH	YDSSEWDWLR	300
		310	320	330	340	350	
LFFAH12	301	GALVTVDROY	GILNKVFHNI	TDTHVAHHLF	ATIPHYNAME	ATEAIKPILG	350
FAH12	301	GAMVTVDROY	GVLNKVFHNI	ADTHVAHHLF	ATVPHYHAME	ATKAIKPIMG	350
ATFAD2	301	GALATVDROY	GILNKVFHNI	TDTHVAHHLF	STMPHYNAME	ATKAIKPILG	350
BNFAD2	301	GALATVDROY	GILNQGPHNI	TOTHEAHHLF	STMPHYHAME	ATKAIKPILG	350
GMFAD2-1	301	GALATMORDY	GILNKVFHNI	TDTHVAHHLF	STMPHYHAME	ATNAIKPILG	350
GMFAD2-2	301	GALATVDROY	GILNKVFHNI	TDTHVAHHLF	STMPHYHAME	ATKAIKPILG	350
ZMFAD2	301	GALATMORDY	GILNRVFHNI	TDTHVAHHLF	STMPHYHAME	ATKAIRPILG	350
RCFAD2	301	GALATVDROY	GILNKVFHNI	TDOVAHHLF	-----	-----	350
		360	370	380	390	400	
LFFAH12	351	DYYHFDGTPW	YVAMYREAKE	CLYVEPDER	GKKGVYYNN	K-L.....	400
FAH12	351	EYYRYDGTPE	YKALWREAKE	CLFVEPDEGA	PTQGVFWYRN	KY-.....	400
ATFAD2	351	DYYQFDGTPW	YVAMYREAKE	CIYVEPDERG	DKKGVYWYNN	K-L.....	400
BNFAD2	351	EYYQFDGTPV	VKAMWREAKE	CIYVEPDROG	EKKGVFWYNN	KL*.....	400
GMFAD2-1	351	EYYQFDOTPE	YKALWREARE	CLYVEPDEGT	SEKGVYWYRN	KY-.....	400
GMFAD2-2	351	EYYRFDETPE	VKAMWREARE	CIYVEPDOST	ESKGVFWYNN	KL-.....	400
ZMFAD2	351	DYYHFDPTPV	AKATWREAGE	CIYVEPE---	DRKGVFWYNK	KF*.....	400

Figur 9B



Figur 10



Plasmidname: pSLJ44026

Plasmidgröße: 25.70 kb

Konstruiert von: Jonathan Jones

Zeitpunkt der Konstruktion: 1992

Kommentare/Verweise: Transgenic Research 1, 285-297 (1992)

**Figur 11**